

FERNANDO AUGUSTO PERRELLA

**ESTUDO DA AÇÃO LOCAL DO RISENDRONATO DE SÓDIO
NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL INDUZIDA EM RATAS**



2011

FERNANDO AUGUSTO PERRELLA

**ESTUDO DA AÇÃO LOCAL DO RISENDRONATO DE SÓDIO
NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL INDUZIDA EM RATAS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor, pelo Programa de Pós- Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientador: Prof. Tit. Horácio Faig Leite

São José dos Campos

2011

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2010.

P426e Perrella, Fernando Augusto.
Estudo da ação local do risendronato de sódio na periodontite experimental
induzida em ratas / Fernando Augusto Perrella. - São José dos Campos : [s.n.],
2011.
163 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São
José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2011.
Orientador: Prof. Tit. Horácio Faig Leite.

1. Periodontite. 2. Bifosfonato. 3. Reabsorção óssea. 4. Osteoclastos. 5.
Osteocalcina. I. Faig Leite, Horácio. II. Faculdade de Odontologia de São José dos
Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista “Julio
de Mesquita Filho”. IV. UNESP – Univ Estadual Paulista. V. Título

tD64

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por
qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 29 de Agosto de 2011.

Assinatura :

E-mail: fernando.perrella@fosjc.unesp.br

BANCA EXAMINADORA

Prof. Tit. Horácio Faig Leite (Orientador)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Prof. Dr. João Batista César Neto

Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo - USP

Prof^a. Dra. Raquel Guedes Fernandes Pires

Faculdade de Pindamonhangaba-FAPI

Prof^a. Adj. Maria Aparecida Neves Jardini

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Prof. Dr. Warley David Kerbauy

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

São José dos Campos, 05 de julho de 2011.

DEDICATÓRIA

Ao **Deus amado** que tudo sabe e
conhece no profundo do meu
coração que a cada dia dá me
ilumina com sua imensa sabedoria
("Mas os que esperam no Senhor
renovarão as suas forças").
A Ele toda honra e toda glória.

A meus pais, **Ana e Waldecir**, meus
irmãos, **Ana e Felipe** e minha avó
Maíza, pessoas que me inspiram
diariamente e nunca deixaram de
estar ao meu lado me
incentivando. E principalmente
pelo carinho e amor sem o qual
não estaria hoje aqui. A quem
dedico esse trabalho.
Muito Obrigado!

Agradecimentos especiais

Ao meu orientador, **Prof. Tit. Horácio Faig Leite**, agradeço imensamente a orientação precisa, dedicação constante e a confiança em mim depositada. Sua competência, experiência e empenho foram fundamentais para concretização deste trabalho. Professor, a quem tenho profundo respeito e admiração pelo profissional e pela pessoa que representa, e a quem também agradeço o apoio e aprendizado que me proporcionou.

A **Prof^a. Dra. Vanessa Ávila Sarmiento Silveira** pela imensa dedicação em todas as etapas desse estudo sem a qual não seria possível sua realização. Muito obrigado pela agradável convivência e pelos conhecimentos transmitidos nesses três anos.

Aos Professores da Disciplina de Periodontia, em especial a **Prof^a. Adj. Maria Aparecida Neves Jardim**, **Prof. Dr. Warley David Kerbauy** e **Prof. Dr. Fernando Renó de Lima** pela imensa participação em minha formação profissional e por sempre acreditarem em meu potencial.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP, na pessoa do seu Diretor, **Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli**, pela oportunidade que me foi dada na Graduação e no curso da Pós-Graduação.

À **Profª. Adj. Cristiane Koga Ito**, coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, pelo auxílio durante esse trabalho.

À **Profª. Drª. Chung Man Ching**, professora de Fármacos e medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da UNESP, Câmpus de Araraquara, pelo fornecimento dos fármacos e pelo auxílio importante no delineamento desse estudo.

Ao **Prof. Ivan Balducci** pela excelente correção e auxílio nas análises estatísticas desse trabalho.

As **Profª. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho** e **Profª. Adj. Adriana Aigotti Brandão** pelos conhecimentos transmitidos nas análises anatomopatológicas. A contribuição de vocês foi muito valiosa.

Ao **Ilmo. Sr. Cel. Int. Gilmar da Cunha Maia**, chefe do GIA-SJ e a **Ilma. Sra. Cap Dent. Liana Kalczuc**, chefe da Divisão de Odontologia, por permitirem que eu pudesse ingressar e concluir o curso de Doutorado.

A todos os docentes e funcionários do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, pelo apoio e convívio durante esse período.

Aos colegas do curso de Doutorado em Biopatologia bucal, **Ana Lourdes, Denia, Flávio, Lilibeth, Luiz Felipe, Marta** pelo agradável convívio nesses anos.

A colega **Tábata Melo Tera**, por sua dedicação, apoio e amizade e estimável auxílio na análise imuno-histoquímica

À colega **Jucely Aparecida da Rosa** pelo seu auxílio na manipulação dos animais do estudo.

Aos demais colegas da Pós-Graduação pela convivência e pela troca de experiências em todos estes anos que passamos juntos.

Às alunas de iniciação científica, **Gabriela e Flávia**, por terem possibilitado a execução de todas as etapas deste trabalho.

Aos funcionários do Biotério, **Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos** e **Marco Antonio Correa Alfredo** pela imensa colaboração durante a fase experimental deste trabalho e à técnica **Maria Salete Faria** por todo o suporte o auxílio no processamento histológico das peças.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação **Erena, Maria Aparecida, Rosemary** pela colaboração em todos os momentos.

Aos amigos **Sérgio** e ao **Domingos**, pelo apoio, amizade e companheirismo e durante este período.

Aos meus **companheiros militares e civis** que servem na **Divisão de Odontologia do Grupamento de Infraestrutura e Apoio de São José dos Campos**, pelo intenso apoio e auxílio além do intenso incentivo para a realização desse trabalho.

Aos **colegas e funcionários** que trabalham comigo no **Centro de Especialidades Odontológicas e no Pronto Socorro Odontológico de Taubaté** pelo companheirismo e amizade construída nesses quatro anos em que estive lá.

Aos meus amigos **Alan, Diogo e Tatiana, Maico e Ana Paula, Fernando e Ana Claudia, Rafael, André, Fábio e Karen** pelos momentos alegres e tristes, de risos e lágrimas (muito mais de risos) que sempre convivemos.

Aos meus queridos **tios e tias, primos e primas** que estão sempre torcendo muito por minhas realizações. Aos meus avós **Antonio Perrella** (*in memoriam*) e **Alice Lizidatti Perrella** (*in memoriam*) que estariam muito orgulhosos do seu neto.

Às amadas pessoas **Adriana, Nilda e Tatiana**, que hoje fazem parte da minha vida e que muito me incentivam para a realização dos meus sonhos.

Aos **animais experimentais**, meu profundo respeito.

“Quantos anos pode existir uma montanha
Antes que ela seja lavada pelo mar?
E quantos anos podem algumas pessoas existir,
Até que sejam permitidas a serem livres?
E quantas vezes pode um homem virar sua cabeça,
E fingir que ele simplesmente não vê?
A resposta, meu amigo, está soprando no vento
A resposta está soprando no vento.”
(Bob Dylan)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS.....	11
RESUMO.....	14
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Etiopatogênese da doença periodontal.....	19
2.2 Resposta imunoinflamatória tecidual.....	20
2.3 Regulação do metabolismo ósseo.....	22
2.4 Mediadores da reabsorção óssea na periodontite.....	27
2.5 Modulação da resposta do hospedeiro como tratamento da periodontite.....	29
2.6 Bifosfonatos (BFs).....	34
2.6.1 Mecanismo de ação e propriedades relacionadas à estrutura química.....	35
2.6.2 Aplicação clínica e efeitos adversos dos bifosfonatos.....	39
2.6.3 Risendronato de sódio (RS).....	41
2.7 Bifosfonatos e Periodontia.....	41
2.7.1 Estudos em animais.....	41
2.7.2 Estudos em humanos.....	48
3 PROPOSIÇÃO.....	52
4 MATERIAL E MÉTODO.....	53
4.1 Animais.....	53
4.2 Delineamento dos grupos.....	53
4.3 Indução da periodontite.....	54
4.4 Preparação do fármaco e tempos de aplicação.....	56
4.5 Eutanásia dos animais.....	58

4.6 Processamento histológico.....	58
4.6.1 Análise histológica.....	59
4.6.2 Análise histomorfométrica.....	60
4.6.3 Análise imuno-histoquímica.....	63
4.6.4 Análise enzimo-histoquímica.....	65
4.7 Análise estatística.....	67
5 RESULTADOS.....	69
5.1 Análise histológica descritiva.....	69
5.1.1 Controle sem doença (C1 e C2).....	69
5.1.2 Grupos A1 e A2 (com ligadura e placebo).....	71
5.1.3 Grupos R1 a R6 (com ligadura e risendronato).....	72
5.2 Análise histomorfométrica	79
5.2.1 Volume trabecular da região da furca (VtF).....	79
5.2.2 Volume trabecular da região da crista óssea inter-radicular (VtC).....	82
5.2.3 Medida de distância linear entre a furca e a crista óssea inter-radicular (DL).....	86
5.3 Análise imuno-histoquímica.....	90
5.4 Análise enzimo-histoquímica.....	101
6 DISCUSSÃO.....	106
7 CONCLUSÃO.....	125
8 REFERÊNCIAS.....	126
APÊNDICES.....	150
ANEXOS.....	162

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	=	Anti-inflamatórios não esteroidais
ALD	=	Alendronato de sódio
ANOVA	=	Análise de variância
ATP	=	Adenosina trifosfato
BF(s)	=	Bifosfonato(s)
BMP	=	Proteína morfogenética óssea
BMU	=	Unidade óssea multicelular
BSA	=	Albumina de soro bovina
° C	=	Grau Celcius
COX	=	Cicloxygenase
CV	=	Coeficiente de variação
DAB	=	Diaminobenzidina
DL	=	Distância linear do teto da furca ao topo da crista óssea
DP	=	Desvio-padrão
EDTA	=	Acido etilenodimetileno tetra-acético
FPP	=	Farnesildifosfato
FDA	=	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	=	Fator de crescimento fibroblástico
g	=	Grama
GD	=	Grupo com aplicação dupla
GGPP	=	Geranylgeranyl difosfato
GU	=	Grupo de aplicação única
HE	=	Hematoxilina-eosina
IFN	=	Interferon
IGF	=	Fator de crescimento insulínico
IL-1 β	=	Interleucina 1 beta

IPP	=	Isopentenil difosfato
IU	=	Unidade internacional
Kg	=	Quilograma
LP	=	Ligamento periodontal
LPS	=	Lipopolissacarídeo
M-CSF	=	Fator formador de colônias de macrófagos
mg	=	Miligrama
mL	=	Mililitro
mM	=	Milimolar
MMPs	=	Metaloproteinases da matriz
N	=	Número de amostras
n	=	Número de células positivas para o TRAP
NO	=	Óxido nítrico
NTx	=	Telopeptídeos N terminal
OAF	=	Fator ativador de osteoclasto
OCC	=	Osteocalcina
ONM	=	Osteonecrose dos maxilares
OPG	=	Osteoprotegerina
PDGF	=	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	=	Potencial hidrogeniônico
PGE ₂	=	Prostaglandina E2
PTHr	=	Receptor do paratormônio
RANK	=	Receptor ativador de fator nuclear Kappa
RANKL	=	Ligante de receptor ativador de fator nuclear Kappa
RAR	=	Raspagem e alisamento radicular
RMP	=	Retalho mucoperiostal de espessura total
ROS	=	Espécies reativas de oxigênio
RS	=	Risendronato de sódio
SDD	=	Dose não antimicrobiana de doxiciclina
TC	=	Tecido conjuntivo
TGF- β	=	Fator de crescimento transformante

TIMP	=	Inibidor tecidual de metaloproteinase
TNF- α	=	Fator de necrose tumoral alfa
TRAP	=	Fosfatase ácida tartarato-resistente
TUNEL	=	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
UFC	=	Unidade formadora de colônias
V _t	=	Volume trabecular
V _{tC}	=	Volume trabecular da crista óssea remanescente
V _{tF}	=	Volume trabecular ósseo na área da furca
μg	=	Micrograma
μL	=	Microlitro
%	=	Porcentagem
Σ	=	Somatório

Perrella FA. Estudo da ação local do risendronato de sódio na periodontite experimental induzida em ratas [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2011.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do uso local de uma solução aquosa de risendronato de sódio (RS) em diferentes concentrações na inibição da perda óssea alveolar decorrente de periodontite experimental induzida em ratas. Os 48 animais foram divididos em 2 grupos constituídos por 24 animais: GD (dupla aplicação) e GU (única aplicação). Os dois grupos foram subdivididos em 8 subgrupos: R1 (duas aplicações de 0,125 mg de RS), R2 (duas aplicações de 0,25 mg de RS), R3 (duas aplicações de 0,5 mg de RS) e A1 (duas aplicações de água destilada); R4 (uma aplicação de 0,125 mg de RS), R5 (uma aplicação de 0,25 mg de RS), R6 (uma aplicação de 0,5 mg de RS) e A2 (uma aplicação de água destilada). Foi induzida a periodontite pela confecção de ligaduras ao redor dos primeiros molares inferiores direitos em todos os animais. Nos grupos A1 e A2, os molares contralaterais serviram de controles negativos (C1 e C2). A medicação foi aplicada aos 5 e 10 dias após indução da periodontite nos animais do GD, e nos animais do GU apenas aos 10 dias. Decorrente 15 dias os animais foram submetidos à eutanásia. Foram feitas análises histológica, histomorfométrica, imuno-histoquímica anti-osteocalcina e enzimo-histoquímica para TRAP (fosfatase ácida tartarato resistente). Os grupos que receberam RS exibiram maior volume trabecular da crista óssea remanescente que o controle significativo estatisticamente, mas não foram observados diferenças entre os grupos tratados. A perda óssea alveolar foi menor nos grupos tratados com risendronato comparado com controle e foi dose-dependente. Os grupos que receberam a menor dose (R1 e R4) apresentaram menor perda óssea estatisticamente significativa que os de dose intermediária (R2 e R5), que por sua vez exibiram menores índices comparados com os de doses maiores (R3 e R6). O número de aplicações, no entanto, não exibiu significância estatística. O número de células TRAP-positivas foi menor no grupo R1, comparado com controle, mas não diferiu estatisticamente dos demais grupos tratados. A imunomarcagem da osteocalcina em osteoblastos foi mais intensa nos grupos tratados com risendronato, especialmente no R1, R2 e R4. A análise histológica mostrou áreas de formação óssea com trabéculas imaturas contendo osteócitos volumosos e revestidas de osteoblastos cuboides e áreas de reabsorção variada, marcada pela presença de osteoclastos com morfologia indicativa de apoptose foram observados nos grupos tratados. Conclui-se que o tratamento local com RS foi eficaz em reduzir a perda óssea decorrente de periodontite induzida e essa redução foi dose-dependente, sem, no entanto, depender da quantidade de aplicações.

Palavras-chave: Periodontite. Bifosfonato. Reabsorção óssea. Osteoclastos. Osteocalcina.

Perrella FA. Study of local action of sodium risendronate in experimentally induced periodontitis in rats [doctorate thesis]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2011.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the local use of an aqueous solution of sodium risendronate (RS) at different concentrations on the inhibition of alveolar bone loss caused by experimental periodontitis induced in rats. The 48 animals were divided into two groups consisting of 24 animals: GD (double application) and GU (one application). The two groups were subdivided into eight subgroups: A1 (two applications of 0.125 mg RS), R2 (two applications of 0.25 mg RS), R3 (two applications of 0.5 mg RS) and A1 (two applications of distilled water), and R4 (one application of 0.125 mg RS), R5 (one application of 0.25 mg RS), R6 (one application of 0.5 mg RS) and A2 (one applications with distilled water). Periodontitis was induced in first molars in all animals. In groups A1 and A2, the contralateral molars served as controls (C1 and C2). The medication was applied at 5 and 10 days after induction of periodontitis in animals of GD, and animals of GU only after 10 days. After 15 days the animals were euthanized. Analysis was performed on histological, histomorphometric, immunohistochemical anti-osteocalcin and enzymohistochemical for TRAP (tartrate resistant acid phosphatase). The groups that received RS exhibited greater volume of trabecular bone crest that controlling statistically significant, but no differences were observed between treated groups. The alveolar bone loss was lower in treated groups compared with placebo and was dose-dependent. The groups that received the lowest dose (R1 and R4) showed statistically significant less bone loss than the intermediate dose (R2 and R5), which in turn exhibited lower rates compared with higher doses (R3 and R6). The two types of approaches, however, did not show statistical significance. The number of TRAP-positive cells was lower in group R1 compared with control, but not statistically different than the other treated groups. A immunostaining of osteocalcin in osteoblasts was more intense in the groups treated with RS, especially in R1, R2 and R4. The microscopic examination showed immature trabecular bone containing osteocytes and lined with large cuboidal osteoblasts and osteoclasts with morphology indicative of apoptosis were observed in the treated groups. We conclude that local treatment with RS was effective in reducing bone loss due to periodontitis induced and this reduction was dose-dependent, without depending on the number of applications.

Keywords: Periodontitis. Bisphosphonate. Bone resorption. Osteoclast. Osteocalcin.

1 INTRODUÇÃO

A patogênese da periodontite envolve complexa interação entre o desafio bacteriano e a resposta inflamatória do hospedeiro e subsequente alteração na homeostase do tecido conjuntivo e ósseo (Page, Kornman, 1997). A presença de um biofilme Gram-negativo periodontopatogênico é necessária, mas não suficiente para induzir o início e a progressão da destruição tecidual na doença (Haffajee, Socransky, 1994; Kornman et al., 1997). A ativação do sistema imunoinflamatório do hospedeiro ocorre através do recrutamento de células de defesa e da liberação de mediadores químicos, citocinas e de enzimas como as metaloproteinases e tem papel importante na promoção da destruição tecidual (Salvi, Lang, 2005). Além disso, a resposta pode ser influenciada por fatores ambientais, adquiridos e genéticos (Offenbacher, 1996; Salvi et al., 1997).

Diante desses conceitos, o uso de substâncias capazes de modular a resposta inflamatória do hospedeiro associadas com medidas de redução bacteriana tem sido estudadas atualmente como abordagens complementares no tratamento da periodontite. Dentre os agentes farmacológicos investigados estão os anti-inflamatórios não esteroidais, os fármacos inibidores das metaloproteinases, como as tetraciclinas modificadas, e substâncias relacionadas com a inibição de osteoclastos, entre eles os bifosfonatos (Reddy et al., 2003).

Os bifosfonatos (BFs) são fármacos amplamente utilizados na área médica para tratamento de doenças caracterizadas pela reabsorção óssea, tais como osteoporose, doença de Paget e tumores ósseos (Russel et al., 1999). Em periodontia, tem sido utilizado para prevenção de perda óssea após cirurgia a retalho ao redor de dentes

e implantes e como coadjuvante ao tratamento da doença periodontal. Os estudos envolvendo bifosfonatos e periodontite tanto em animais e como em humanos têm mostrado resultados animadores. Reddy et al. (2003), através de revisão sistemática da literatura, afirmaram que, apesar de existirem poucos estudos relatados, os dados preliminares indicam que há grande potencial desses fármacos trazerem benefícios à terapia periodontal.

A ação sistêmica dos bifosfonatos é limitada em alguns casos, pois apresentam baixa absorção no trato gastrointestinal e no plasma sanguíneo desaparecem rapidamente, depositando-se no osso de forma não homogênea (Lin, 1996). De acordo com a literatura, a ação local desses medicamentos parece ser mais efetiva (Meraw et al., 1999; Yaffe et al., 2000; Shibata et al., 2004), no entanto, ainda não se identificou a melhor forma de biodisponibilizar o fármaco localmente para que haja uma ação positiva no processo de reparo ósseo (Fernandes, 2005; Nobre et al., 2008, Cannetieri et al., 2009). Alguns autores sugerem que esse medicamento apresente uma resposta bifásica e que diferentes concentrações podem resultar em efeitos distintos (Weinreb et al., 1994; Silva, 2000; Binderman et al., 2000).

O uso de substâncias locais no tratamento da periodontite consiste na aplicação de fármacos diretamente dentro das bolsas e defeitos ósseos e apresenta vantagens em relação à terapia sistêmica como o uso de concentrações mais elevadas, menores efeitos adversos e colaterais além de não depender da colaboração do paciente. Existem poucos trabalhos na literatura envolvendo o uso de BFs aplicados localmente em bolsas periodontais. Estudos recentes em modelos animais investigaram a ação dessas substâncias como agentes de irrigação (Mitsuta et al., 2002; Goya et al., 2006) ou embebidos em géis e dispositivos (Yaffe et al., 2000) e os resultados são promissores. Entretanto, a dificuldade de padronização dos métodos, as diferentes

classes e concentrações dos bifosfonatos ainda não permitem seguras aplicações clínicas.

O risendronato de sódio ou 2-hidroxi-etilideno 2-(3-piridinidil)-1,1 bifosfonato dissódio 1 é um aminobisfosfonato de terceira geração e seu mecanismo básico de ação é a inibição da reabsorção óssea através da inativação de osteoclastos (Crandall, 2001). Cetinkaya et al., 2008, mostraram efeito inibitório com o uso de risendronato sistêmico na perda óssea alveolar comparado com placebo em periodontite experimental. Entretanto, não foram encontrados na literatura estudos envolvendo a ação local desse fármaco associado à progressão e ao tratamento da periodontite.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho é investigar a ação local do risendronato de sódio na inibição da perda óssea alveolar decorrente da periodontite experimental em ratas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etiopatogênese da doença periodontal

A periodontite é uma doença de etiologia multifatorial, que envolve a presença de micro-organismos patogênicos num hospedeiro susceptível, sofrendo influência ainda de fatores genéticos e ambientais. (Page, Kornman, 1997).

Embora a presença dos periodontopatógenos seja essencial para o início e progressão da periodontite, as bactérias isoladas não são suficientes no processo fisiopatológico de destruição dos tecidos de inserção periodontais (Offenbacher, 1996). A reação do hospedeiro manifestada pela resposta imunoinflamatória desempenha um importante papel na patogênese da doença periodontal, por contribuir para o processo da doença ou por modular os efeitos produzidos pelas bactérias (Genco, 1992).

O desequilíbrio entre o desafio microbiano, por meio de fatores de virulência, como lipopolissacarídeos, leucotoxinas, enzimas, e mecanismos de defesa do hospedeiro, produz uma cascata de eventos observada inicialmente por meio de uma resposta inflamatória, onde há liberação de mediadores químicos como prostaglandinas e citocinas por células inflamatórias que ativam o sistema imune culminando na destruição do tecido conjuntivo periodontal e reabsorção óssea alveolar (Kornman, et al., 2008). Dessa forma, o hospedeiro além de promover a proteção e defesa dos tecidos, tem a capacidade de provocar sua destruição (Kinane, Lindhe, 2005).

De modo geral, fatores genéticos e sistêmicos podem interferir na progressão da periodontite por promoverem alterações celulares intrínsecas exacerbando a resposta imunoinflamatória e por consequência agravando a doença (Page, Kornman, 1997).

2.2 Resposta imunoinflamatória tecidual

O processo inflamatório consiste em uma reação complexa e inata dos tecidos vascularizados, caracterizado fundamentalmente como uma resposta protetora do organismo cujo objetivo final é eliminar o fator agressor e assim manter a homeostasia local. No entanto, a inflamação e a reparação ineficazes podem resultar em uma lesão crônica, que não se resolve, ou, se excessivamente distribuída, em uma lesão na qual as respostas do hospedeiro contribuem significativamente para o processo destrutivo (Trowbridge, Emling, 1996).

Imediatamente após a agressão, inicia-se a fase aguda da inflamação caracterizada pela vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e exsudação plasmática e celular principalmente de neutrófilos. Os mediadores químicos que regem essa fase são os de ação rápida dos quais histamina, bradicinina e derivados do ácido araquidônico como prostaglandinas e leucotrienos são os mais comuns. Se o agente agressor não for controlado e a homeostasia restabelecida, o contato de células apresentadoras de antígenos do hospedeiro com micro-organismos ativa a resposta imune adquirida. Isto leva a um aumento na presença de células mononucleares e a lesão crônica se instala. Outros mediadores bioquímicos provenientes do plasma e de células amplificam a resposta inflamatória e influenciam sua evolução (Kumar et al., 2002). Entretanto, na doença periodontal, essas fases clássicas da inflamação aguda e crônica não são facilmente aplicadas (Kinane et al., 2005).

A inflamação crônica pode ser definida como aquela de longa duração na qual a inflamação ativa (edema, infiltrado de células mononucleares – macrófagos, linfócitos e plasmócitos), destruição tecidual (liberação de enzimas – ex: metaloproteinases; citocinas – ex: IL-1 β , TNF- α) e tentativas de reparo por fibrose estão ocorrendo simultaneamente. Geralmente, a inflamação crônica pode suceder a inflamação aguda, mas existem casos em que pode ser crônica quase desde o início, começando de maneira insidiosa, como uma resposta de baixo grau, latente e muitas vezes assintomática (Trowbridge, Emling, 1996).

Apesar dos mecanismos de defesa como a fagocitose e a neutralização de agentes agressores representarem efeito benéfico do hospedeiro, o resultado dessa interação pode ser prejudicial se grande quantidade de mediadores pró-inflamatórios (citocinas, sistema complemento, radicais livres, peróxidos e superóxidos de oxigênio, derivados do ácido araquidônico) forem liberados nos tecidos adjacentes causando a destruição tecidual local (Gemmell et al., 1997).

Outro fator observado no processo inflamatório crônico é o desequilíbrio no *turnover* tecidual principalmente por ação de enzimas como as metaloproteinases da matriz (MMPs). Ohlsson e Olsson, em 1973, observaram presença elevada dessa enzima em sítios doentes em relação às áreas saudáveis. Haerian et al., em 1995, mostraram que após o tratamento periodontal, os níveis de MMPs diminuíram. Esses autores sugerem que as ações dessas enzimas ao degradar as fibras colágenas e matriz geram maior espaço para as células do processo inflamatório.

Como a inflamação é um processo dependente de mediadores de natureza variada (citocinas), que comandam a intensidade e a qualidade do processo, ela sofre grande influência dos genes que codificam e que regulam a expressão desses mediadores (Kumar et al., 2002). Dessa forma, inúmeros estudos têm mostrado a associação de

polimorfismos genéticos principalmente de citocinas e a exacerbação de doenças crônicas, dentre elas a periodontite (Nikolopoulos et al., 2008).

2.3 Regulação do metabolismo ósseo

O osso é um órgão metabolicamente ativo composto por uma fase mineral calcificada (matriz óssea) e outra orgânica (células). As principais funções do tecido ósseo destacam-se: ser suporte para as partes moles do corpo; proteger órgãos vitais; apoio muscular e movimento; depósito de cálcio e fósforo; formação das células do sangue (Junqueira, Carneiro, 2005).

Macroscopicamente, pode ser observado que o osso é formado por partes sem cavidades visíveis, o osso compacto, e por partes com muitas cavidades intercomunicantes, o osso esponjoso. Na análise microscópica, esses padrões ósseos, porém, tem a mesma estrutura histológica básica (Junqueira, Carneiro, 2005). Ambos são observados no osso alveolar.

As principais células do tecido ósseo são os osteoblastos e osteoclastos. Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas derivados dos monócitos sanguíneos que reabsorvem osso através da secreção de enzimas proteolíticas (Wu et al., 2009). Os osteoblastos são derivados das células mesenquimais indiferenciadas e secretam as proteínas da matriz óssea que posteriormente se torna mineralizada. Apesar de serem responsáveis pela formação óssea, os osteoblastos estimulam a reabsorção óssea pelos osteoclastos através de citocinas e sinalizadores celulares (Junqueira, Carneiro, 2005).

A formação e reabsorção óssea são processos conjugados e no indivíduo adulto estão em estado de equilíbrio. Entretanto, em algumas situações tanto fisiológicas, por exemplo no

crescimento, como patológicas, esses processos podem ocorrer independentemente (Corral et al., 1998).

Para cada unidade multicelular óssea (BMU), que inclui osteoclastos e osteoblastos, o processo de reabsorção leva em torno de 3 a 4 semanas e a formação de 3 a 4 meses (McCauley, Nohutcu, 2002). Estima-se que um esqueleto adulto contenha mais de um milhão de BMUs agindo simultaneamente, com quantidade aproximadamente 5 vezes maior localizados no osso trabecular se comparado ao osso compacto (Parfitt, 1994).

A formação óssea está relacionada à atividade de síntese dos osteoblastos. Essas células são derivadas de um precursor mesenquimal e percorrem um padrão bem definido de diferenciação. As células precursoras diferenciam-se em pré-osteoblastos pela ação de proteínas morfogenéticas (BMPs). Outros fatores de crescimento, como PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), TGF- β (fator de crescimento transformante), IGF (fator de crescimento insulínico) e FGF (fator de crescimento fibroblástico), promovem proliferação osteoblástica e dessa forma tem sido utilizados no tratamento periodontal regenerativo (Giannobile, 1996). Após a maturação, os osteoblastos expressam características fenotípicas usadas em sua identificação, como a osteocalcina, o receptor de PTH (PTHr) e a sialoproteína óssea (Seibel, 2000). O tempo de vida dos osteoblastos foi estimada em 3 meses. Subsequentemente, o osteoblasto aprisiona-se na matriz, sendo chamado de osteócito, uma célula com menor capacidade de síntese que se comunicam entre si, sendo importante no equilíbrio do cálcio (McCauley, Nohutcu, 2002; Junqueira, Carneiro, 2005).

A osteocalcina (OCC) anteriormente chamada de proteína GLA-óssea é uma proteína de 5 KDa ligante a hidroxiapatita e exclusivamente produzida por osteoblastos, odontoblastos, cementoblastos e condróctios hipertróficos (Gallop et al., 1980; Hauschka et al., 1989; Raymond et al., 1999; Seibel, 2000). A OCC é considerada

um marcador específico da função osteoblástica. Estima-se que, após sua liberação pelos osteoblastos, a maior parte dessa proteína recém-sintetizada seja incorporada à matriz óssea extracelular, onde constitui aproximadamente 15% das proteínas não-colágenas do osso. Uma pequena fração é liberada na circulação e pode ser detectada por imunoenaios (Seibel, 2000). Níveis sorológicos de OCC imunorreativa têm demonstrado boa correlação com a taxa de formação óssea observadas pela análise de histomorfometria (Delmas et al., 1985; Fournier et al., 1992).

Os osteoclastos são células derivadas da linhagem hematopoiética e chegam aos sítios de reabsorção pela corrente sanguínea. Essas células são multinucleadas, e a membrana na sua base tem a forma ondulada que asseguram sua adesão ao tecido mineralizado e promovem uma área clara na qual atuam as bombas de prótons que regulam a concentração de hidrogênio e o pH e permitem um microambiente de dissolução dos cristais de hidroxiapatita, a parte inorgânica do osso. Para a dissolução da matriz orgânica, essas células produzem séries de enzimas proteolíticas, tais como proteinases lisossomais, MMPs, catepsina K, entre outras. Essas células passam por repetidos ciclos de reabsorção e sofrem apoptose em média após duas semanas (Wu et al., 2009).

Outra enzima importante liberada pelos osteoclastos e que vem chamando atenção durante o processo de reabsorção óssea é a fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP 5b). Também conhecida como uteroferina ou fosfatase ácida púrpura, a enzima TRAP foi demonstrada inicialmente por Li et al., em 1970, através de análises de coloração citoquímica em células ciliadas de endoteliose reticular leucêmica. Posteriormente, por ser resistente ao tartarato, a TRAP tem sido utilizada como marcador citoquímico de osteoclastos e seus precursores (Igarashi et al., 2002). Outros tipos de fosfatases ácidas associados ao

metabolismo de outros tecidos têm sido descritas na literatura (Bull et al., 2002).

As funções da TRAP no processo de reabsorção óssea ainda não estão totalmente esclarecidas, porém sabe-se que são produzidas por osteoclastos e por serem fosfatases inespecíficas, podem degradar proteínas da matriz óssea, como a osteopontina, sialoproteína óssea e osteonectina (Ek-Rylander et al., 1994). Ainda, no interior da célula, a TRAP pode aumentar a liberação de radicais reativos de oxigênio (ROS), substâncias potencialmente deletérias ao tecido ósseo (Hallen et al., 1999). Interessantemente, de acordo com Asou et al., 2001, a osteopontina é essencial para a reabsorção óssea por facilitar a adesão dos osteoclastos ao osso através de integrinas, como a $\alpha V\beta 3$. Dessa forma, a TRAP parece tanto participar do processo de degradação da matriz como modular a adesão e a migração de osteoclastos no tecido ósseo (Bull et al., 2002).

Após ser secretada, a TRAP é metabolizada por processos fisiológicos, presente nos fluídos corpóreos. Essa enzima tende a se ligar a uma molécula de alto peso molecular no soro chamada α -macroglobulina (Brehme et al., 1999). Essa molécula parece ser responsável pela sua inativação, remoção das áreas de reabsorção óssea e seu aparecimento na corrente sanguínea. O nível sérico dessa enzima pode ser quantificado e dessa forma pode ser indicativo de processos patológicos associados à reabsorção óssea, como a osteoporose, a doença de Paget e sarcomas ósseos (Seibel, 2000; Coleman et al., 2008; Vasikaran, 2008; Eastel et al., 2008). A associação da TRAP com a periodontite tem sido verificada pela sua expressão citoquímica em estudos animais (Spolidorio et al., 2007; Feitosa et al., 2009).

Na remodelação óssea normal, células da linhagem osteoblástica regulam a diferenciação osteoclástica. Existem duas vias consideradas essenciais no processo de osteoclastogênese. A primeira é através da molécula M-CSF (fator formador de colônias de macrófagos)

liberada por osteoblastos e que atua nos primeiros estágios da diferenciação celular. Posteriormente, os pré-osteoclastos são regulados pela via RANK-RANKL-OPG através do contato célula-célula com os osteoblastos (Aubin, Bonnelye, 2000; Boyce et al., 2009).

Os pré-osteoclastos e osteoclastos possuem em sua superfície um receptor conhecido como RANK (Receptor ativador de fator nuclear Kappa β) e é específico para seu ativador, o RANKL (ligante do RANK), molécula transmembrana expressa na superfície de osteoblastos (Leibbrand, Penninger, 2009). Quando ocorre a interação de ligante e receptor na superfície das células precursoras dos osteoclastos, é que se traduz o sinal essencial para a osteoclastogênese (Boyce et al., 2009).

A OPG (osteoprotegerina) é uma glicoproteína secretada pelos osteoblastos em resposta a fatores osteotrópicos ou citocinas, agindo como um receptor solúvel para o RANKL do próprio osteoblasto, inibindo sua interação com o RANK dos osteoclastos. Dessa forma, a OPG é considerada um regulador fisiológico importante na diferenciação e função dos osteoclastos, desempenhando um papel protetor (Aubin, Bonnelye, 2000).

Um desequilíbrio do balanço RANK-RANKL-OPG por fatores hormonais, inflamatórios ou infecciosos tem sido associado a inúmeras doenças ósseas destrutivas, como a osteoporose, a artrite reumatóide, a periodontite, entre outras (Anandarajah, Schwarz, 2009). Além disso, estudos recentes têm mostrado associação desse sistema tanto a processos fisiológicos, como a lactação como a outras patologias não ósseas, como tumores de mama e próstata (Terpos et al., 2009).

2.4 Mediadores da reabsorção óssea na periodontite

A causa principal da reabsorção óssea é a inflamação crônica gerada pela interação dos micro-organismos com os tecidos periodontais. A destruição tecidual na periodontite é mediada principalmente por citocinas inflamatórias e substâncias derivadas das bactérias que atuam basicamente desregulando o sistema RANK-RANKL-OPG (Kantarci et al., 2006).

Os micro-organismos da placa bacteriana normalmente não são encontrados no tecido conjuntivo gengival, porém alguns de seus componentes são solúveis (principalmente proteínas) e entram em contato com os tecidos periodontais (Nair et al., 1996). Dentre os produtos bacterianos destacam-se as enzimas e toxinas, como a leucotoxina do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e componentes estruturais como o lipopolissacarídeo (LPS) de espécies Gram negativas e fímbrias. O LPS parece não ter efeito direto nas células ósseas, mas é um potente indutor de reabsorção por ativar células inflamatórias a produzir citocinas e acelerar a osteoclastogênese (Sismey-Durrant, Hopps, 1987; Holt et al., 1991; Gopalsami et al., 1993; Rogers et al., 2007).

A literatura atual tem apontado que o biofilme bacteriano e seus subprodutos afetam as células imunes no tecido conjuntivo e células do tecido ósseo. Nas células relacionadas ao processo imunoinflamatório como neutrófilos, macrófagos e linfócitos, esses produtos induzem a produção de citocinas como IL-1 β (interleucina 1 β), IL-6 (interleucina 6), TNF- α (fator de necrose tumoral α) e PGE₂ (prostaglandina E₂), bem como outros mediadores inflamatórios que modificam o balanço de remodelação óssea, aumentando a atividade osteoclástica e inibindo a função osteoblástica, o que invariavelmente leva à destruição do tecido conjuntivo e reabsorção óssea (Schwartz et al., 1997).

Em estudo clássico, Horton et al., em 1972, identificou um fator ativador de osteoclasto (OAF) produzido em resposta a placa bacteriana periodontal. Posteriormente, o OAF foi identificado como IL-1, um dos agentes mais potentes na reabsorção óssea. A IL-1 é secretada em duas formas moleculares, α e β , por uma variedade de células, incluindo macrófagos, linfócitos B, neutrófilos, fibroblastos e células epiteliais, e está envolvida em processos pró-inflamatórios, degradação da matriz e cicatrização (Boch et al., 2001). A IL-6 e o TNF- α (fator de necrose tumoral) são citocinas pró-inflamatórias que tem atividade similar à IL-1 na reabsorção óssea na ativação direta das células da linhagem osteoclástica (Bartold, Narayanan, 2006).

As prostaglandinas são eicosanóides derivados do ácido araquidônico e produzidos nos tecidos de acordo com as necessidades e estímulos, embora também estejam relacionados a processos fisiológicos (Gemmell et al., 1997). Na periodontite, a participação da prostaglandinas no processo de destruição óssea é marcante, principalmente pela PGE₂. Essas prostaglandinas são potentes agentes pró-inflamatórios, como a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, e indutores da produção de outras citocinas, como a IL-1 e TNF. A PGE₂ age sobre os fibroblastos e osteoclastos induzindo a liberação de MMPs, que é relevante para o processo de renovação e destruição tecidual. Da mesma forma, inúmeros estudos têm mostrado que o fluido crevicular gengival de sítios com periodontite contem níveis de PGE₂ significativamente maiores dos observados em sítios sadios ou com gengivite (Offenbacher et al., 1993).

Diante desse contexto, é correto afirmar que a maior parte da destruição tecidual na periodontite ocorre em função de uma resposta exacerbada dos mecanismos imunoinflamatórios do hospedeiro diante de um fator agressor, a placa bacteriana e seus subprodutos. Portanto, estudos envolvendo a modulação da resposta do hospedeiro por agentes terapêuticos têm sido propostos tendo como objetivo principal auxiliar o

tratamento da periodontite, principalmente nos casos mais agressivos (Kantarci et al., 2006).

2.5 Modulação da resposta do hospedeiro como tratamento da periodontite

O sistema de defesa pode ser dividido em processo inato ou adquirido. A imunidade inata depende basicamente de fagócitos, cuja principal função é combater quaisquer agentes agressivos. A imunidade adquirida está relacionada principalmente a linfócitos e possui especificidade ao agente agressor. A maioria das infecções pode ser contornada com sucesso pela imunidade inata e não causam doenças. Outras que não são resolvidas pelo processo inato, são combatidas pela imunidade adquirida. Entretanto, como todos os sistemas da natureza, a imunidade não é perfeita ou isenta de falhas, haja vista a gama de doenças alérgicas e auto-imunes. Além disso, o sistema imune está associado a outros fatores, como os nutricionais, genéticos e ambientais (Kantarci et al., 2006).

A manipulação da resposta imune tem sido utilizada no tratamento de algumas condições como na auto-imunidade, alergias e rejeições de transplantes. A sua aplicação no tratamento de infecções tem como objetivo auxiliar o hospedeiro no combate aos agentes suplementando os mecanismos de defesa naturais inerente ou modificar sua resposta alterando o curso das vias inflamatórias (Hamill et al., 2008). De acordo com Giannobile (2008), comparado com outras modalidades terapêuticas contra infecções, a modulação da resposta do hospedeiro gera menos efeitos colaterais, não é invasiva e não requer métodos de aplicações complicadas.

Dentre as abordagens farmacológicas empregadas na periodontia podem-se destacar basicamente três vias de ação: os moduladores do processo imunoinflamatório, como anti-inflamatórios não esteroidais, inibidores de citocinas e inibidores do Óxido Nítrico (NO); os agentes que bloqueiam enzimas teciduais, como inibidores de metaloproteinases e as tetraciclinas modificadas; e os agentes que inibem a osteoclastogênese, como os bifosfonatos. Por meio da Figura 1, observa-se resumidamente o local de ação de cada fármaco em relação à patogênese da periodontite.

Uma das classes farmacológicas mais utilizadas para bloquear o processo inflamatório tanto nos tecidos periodontais quanto em qualquer parte do corpo são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). A razão básica na utilização de AINEs é bloquear os metabólitos do ácido araquidônico, principalmente prostaglandinas e leucotrienos, que são mediadores pró-inflamatórios envolvidos em uma variedade de processos de degradação tecidual e reabsorção óssea. Estudos em animais e em humanos evidenciam que o uso de anti-inflamatórios reduz a perda óssea causada pela doença periodontal (Jeffcoat et al., 1986; Offenbacher et al., 1987; Williams et al., 1988; Jeffcoat et al., 1995; Gurgel et al., 2004).

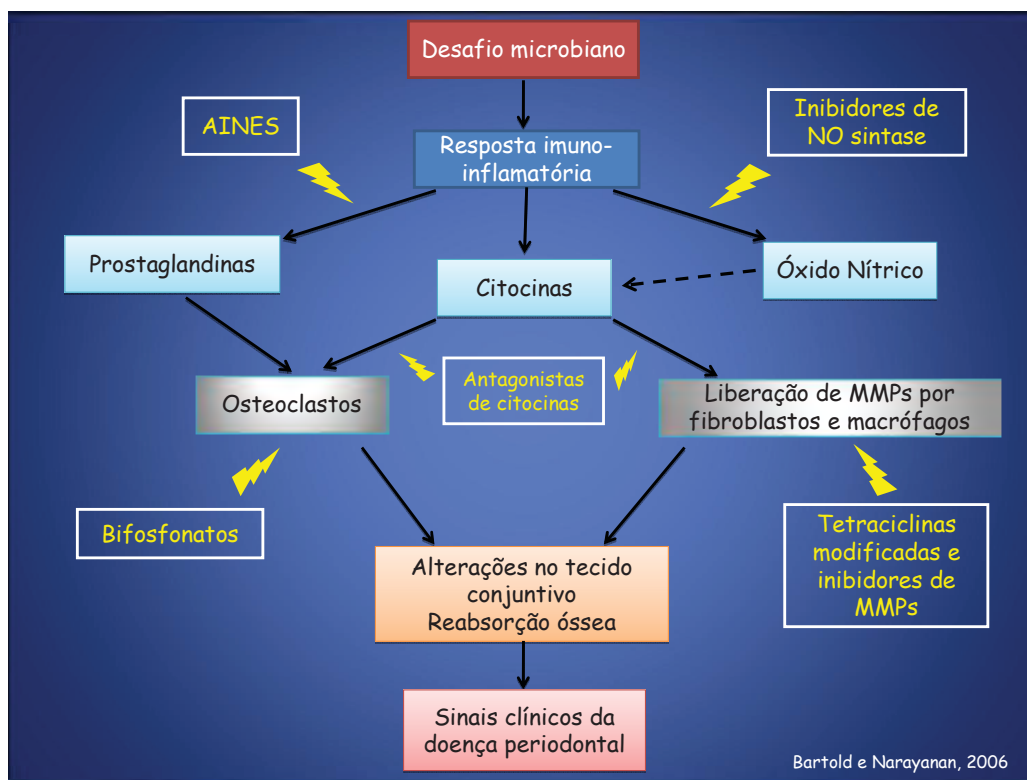


Figura 1 - Processos de degradação tecidual na periodontite e agentes terapêuticos potenciais (Bartold, Narayanan, 2006).

No entanto, existem duas principais classes de AINES: os não seletivos para cicloxigenase-2 (COX-2) e os seletivos para COX-2. A cicloxigenase é uma enzima que converte o ácido araquidônico em prostaglandinas e possui 3 isoformas, que atuam em diferentes processos fisiopatológicos. A COX-1 é constitutiva e está mais relacionada a processos fisiológicos, como a proteção gástrica e a pressão sanguínea. Enquanto que a COX-2, denominada induzida ou patológica, é rapidamente produzida em resposta a uma variedade de estímulos pró-inflamatórios (Hart, Kornman, 1997). Os AINES não seletivos, portanto, bloqueiam ambas as vias e tendem a causar efeitos colaterais e indesejados principalmente no trato gastrointestinal. No entanto, o uso prolongado de AINES seletivos tem sido associado ao desenvolvimento de hipertensão, edema e doenças cardíacas. Outra desvantagem da utilização de AINES na terapia da periodontite é que o bloqueio ocorre em

apenas uma das vias do processo inflamatório visto que o ácido araquidônico pode sofrer ação da lipoxigenase e dar origem aos leucotrienos cujas ações pró-inflamatórias são semelhantes às das prostaglandinas. Por esses motivos, o uso de AINEs da forma tradicional não tem sido atualmente associado ao tratamento periodontal clínico de rotina (Reddy et al., 2003).

As doenças imunoinflamatórias apresentam um processo na qual há superioridade de atuação das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IFN- γ) sobre citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, TGF- β). Dessa forma, estratégias que visam à neutralização dessas citocinas inflamatórias têm sido desenvolvidas principalmente no combate de doenças crônicas, como a artrite reumatóide e a Doença de Crohn (Elliott, Maini, 1994; Andreakos et al., 2002).

Na Periodontia, foram estudados modelos animais na qual se utilizaram receptores solúveis de IL-1 β e TNF- α e os resultados exibiram redução da perda de inserção conjuntiva e osso alveolar, demonstrando que esses receptores podem ser uma terapia potencial por retardar o processo de destruição tecidual (Graves et al., 1998; Delima et al., 2001). Entretanto, alguns pesquisadores sugerem maior aprofundamento nesses estudos, visto que, várias citocinas têm seus efeitos redundantes e apenas o bloqueio de uma delas parece não ser muito efetivo para o tratamento de doenças crônicas (Conraads et al., 2005). Ainda, o conceito de terapia de modulação imune, que consiste em equilibrar as citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, parece ser mais apropriado do que neutralizar a atividade de uma citocina apenas (Bolton, 2005).

As MMPs desempenham papel importante na remodelação tecidual em várias situações fisiológicas, incluindo na remodelação, reparo tecidual e na angiogênese. Em algumas condições patológicas, como doenças inflamatórias, tumores e metástases, observa-se o aumento dessas enzimas o que proporciona a destruição tecidual. As

principais MMPs envolvidas na perda tecidual na periodontite são a MMP-2 e a MMP-8 (Bartold, Narayanan, 2006).

A sua atividade pode ser bloqueada ou modulada por inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) que são produzidos pelas mesmas células que liberam as MMPs. Entretanto, até a presente data, não existem estudos envolvendo a aplicação desses inibidores sintéticos na prevenção da perda tecidual na periodontite.

O principal agente antiproteinase utilizado na periodontite é a tetraciclina. No final dos anos 80 e início da década de 90, alguns estudos mostraram que além da sua capacidade antimicrobiana, essa classe de fármaco tinha a capacidade de reduzir a atividade de neutrófilos e osteoclastos e inibir a ação das metaloproteinases da matriz (Golub et al., 1987; Rifkin et al., 1993; Yu et al., 1993). A descoberta de um sítio na molécula de tetraciclina responsável pela atividade inibitória nas MMPs levou ao desenvolvimento de uma série de fármacos análogos não antimicrobianos, chamados tetraciclinas quimicamente modificadas (Ramamurthy et al., 2002).

A principal droga dessa classe de tetraciclinas desenvolvida como inibidor das collagenases é o hclato de doxiciclina em dose não antimicrobiana (SDD) (Periostat®) e está aprovada para seu uso em humanos pela FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos da América. Reddy et al., 2003, em revisão sistemática da literatura, mostrou que a raspagem e alisamento radicular (RAR) associada ao SDD por 9 meses exibiu maior ganho de inserção e redução na profundidade de bolsa comparado ao tratamento somente com raspagem. Mais recentemente, Preshaw et al., 2008, através de estudo multicentro com 226 indivíduos, randomizado, duplo-cego e controlado com placebo, relatou que a associação do SDD diário à RAR exibiu benefícios clínicos comparados a somente RAR.

Apesar das evidências científicas mostrarem que o uso concomitante das tetraciclinas modificadas podem ser benéficas no

tratamento periodontal, de acordo com Giannobile, 2008, algumas questões necessitam ser respondidas, tais como, o efeito sistêmico em longo prazo da inibição das MMPs e seu papel na homeostasia óssea e no câncer. Nuti et al., 2007, sugerem que se prossigam a investigação sobre o papel das MMPs no metabolismo ósseo e nas patologias, como a periodontite e tumores para o desenvolvimento de fármacos mais específicos na qual sejam reduzidos os efeitos indesejados e potencializado sua eficácia.

2.6 Bifosfonatos (BFs)

Os bifosfonatos (BFs), também chamados de difosfonatos são compostos sintéticos análogos ao pirofosfato presente no organismo. O pirofosfato é constituído por um átomo de oxigênio que está ligado a dois grupos de fosfato (P-O-P). Nos bifosfonatos este átomo de oxigênio é substituído por um átomo de carbono (P-C-P), sendo que o átomo de carbono que liga os dois grupos de fosfato confere grande resistência à molécula de bifosfonato (Russell, 2007).

Segundo Fleisch (1997), alterações nos radicais (cadeias laterais) e esterificação dos grupos fosfato resultaram no grande número de diferentes bifosfonatos descritos até hoje, onde cada um deles apresenta características físico-químicas e biológicas próprias, mas todos eles possuem forte afinidade pelo fosfato de cálcio da hidroxiapatita e, portanto pelo tecido ósseo.

Da mesma forma que os pirofosfatos, os BFs eram inicialmente utilizados como inibidores da mineralização e calcificação em tecidos moles, incluindo pele, rins e vasos sanguíneos. Com a intensificação dos estudos, descobriu-se que os BFs tinham a capacidade de inibir a reabsorção óssea. A partir desse ponto, pesquisas envolvendo

o uso dos BFs em modelos animais de osteopenia e osteoporose foram realizadas e mostraram que esses fármacos inibiam a reabsorção óssea e melhoravam as propriedades biomecânicas do osso (Schenk et al., 1986; Muehlbauer et al., 1991).

2.6.1 Mecanismo de ação e propriedades relacionadas à estrutura química

O núcleo P-C-P dos bifosfonatos é responsável pela forte afinidade do bifosfonato ao osso e permite um número de variação na sua estrutura, baseada na substituição das posições R1 e R2 no átomo de carbono. A habilidade dos bifosfonatos em se ligarem ao mineral ósseo previne o crescimento e a dissolução de cristais, sendo maior quando a cadeia lateral R1 é um grupo hidroxila (OH) ao invés de um cloreto (Cl⁻). A cadeia lateral R2 determina a potência do bifosfonato e basicamente divide os bifosfonatos em três categorias: de primeira geração ou bifosfonatos simples, quando a R2 é constituída por – CH₃, como no etidronato; de segunda geração, quando a R2 contém um radical amina não cíclico (NH₂), como no alendronato e de terceira geração quando a R2 contém átomos de nitrogênio em cadeia cíclica, como no risendronato e no pamidronato (Russel, 2007). A Figura 2 mostra os diferentes bifosfonatos e suas respectivas estruturas químicas.

A capacidade antirreabsortiva dos bifosfonatos está intimamente ligada à sua estrutura química. Os compostos que contém um átomo primário de nitrogênio na posição R2, como o alendronato e o pamidronato, são de 10 a 100 vezes mais potentes que os bifosfonatos simples (etidronato e clodronato). Os bifosfonatos mais potentes, com capacidade antirreabsortiva de 1000 a 10000 vezes maior que os bifosfonatos simples, são os que contêm átomo de nitrogênio em anel

heterocíclico na posição R2, como o risendronato e o zoledronato (Russel, 2007).

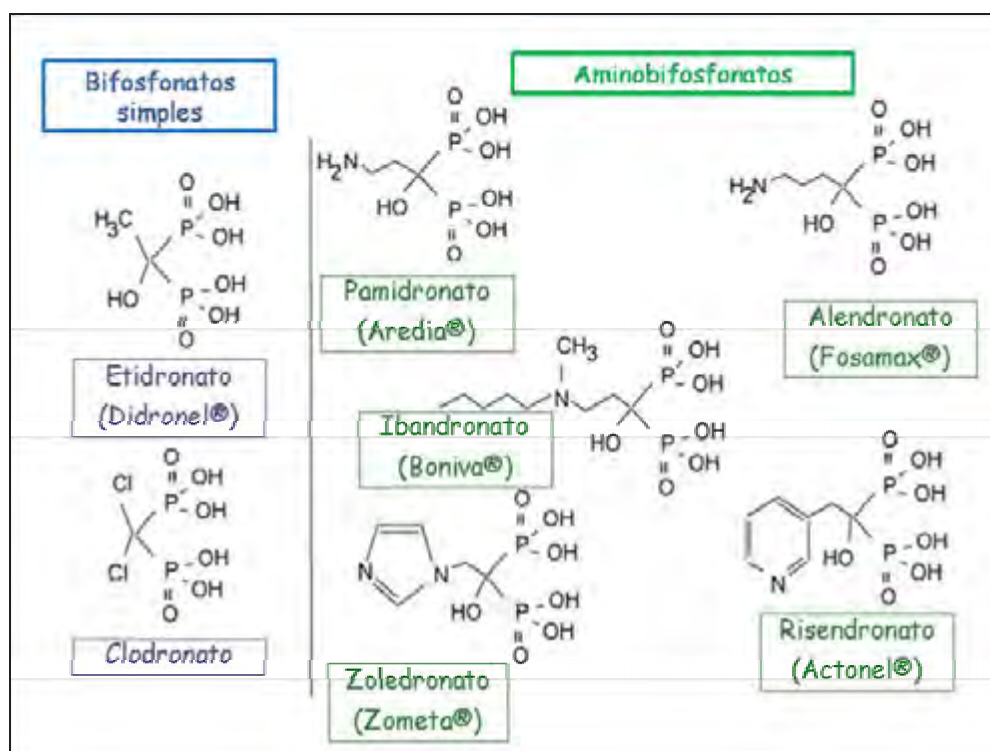


Figura 2 - Estrutura química dos principais bifosfonatos (Russel, 2007).

Esses fármacos apresentam alta afinidade pelo Ca^+ dos cristais de hidroxiapatita dos tecidos mineralizados. Após serem administrados, rapidamente se depositam nos ossos e podem permanecer por longos períodos. Durante a remodelação óssea, os BFs são ingeridos pelos osteoclastos por endocitose e dentro das células atuam em processos bioquímicos alterando a função celular (Roelofs et al., 2006).

Dois processos bioquímicos intracelulares distintos são afetados pelos BFs e são dependentes de sua estrutura química. Os BFs simples são incorporados metabolicamente em análogos não hidrolizáveis de ATP. O acúmulo desses metabólitos dentro dos osteoclastos inibe a função celular causando sua morte. Em contraste, os aminobifosfonatos

interferem com outras reações metabólicas, por exemplo, na via do mevalonato. Esta é uma via biossintética responsável pela produção de colesterol e lipídios isoprenóides como o isopentenil difosfato (IPP), farnesildifosfato (FPP) e geranilgeranil difosfato (GGPP). FPP e GGPP participam na prenilação de pequenas GTPases como Ras, Rho, Rac e Rab. Os aminobifosfonatos alteram a ação da enzima FPP sintase e por consequência inibem a prenilação das GTPases (Roelofs et al., 2006). A prenilação envolve a transferência de lipídeos de grupos farnesil e geranilgeranil para um resíduo de cisteína da GTPase, permitindo que esta se ancore nas membranas celulares. As GTPases são essenciais na manutenção do citoesqueleto e tráfego de vesículas. Esses bifosfonatos ao modificarem essa via, interferem na função osteoclástica, alteram profundamente sua capacidade reabsortiva e induzem apoptose (Russel, Rogers, 1999; Rogers et al., 2000) (Figura 3).

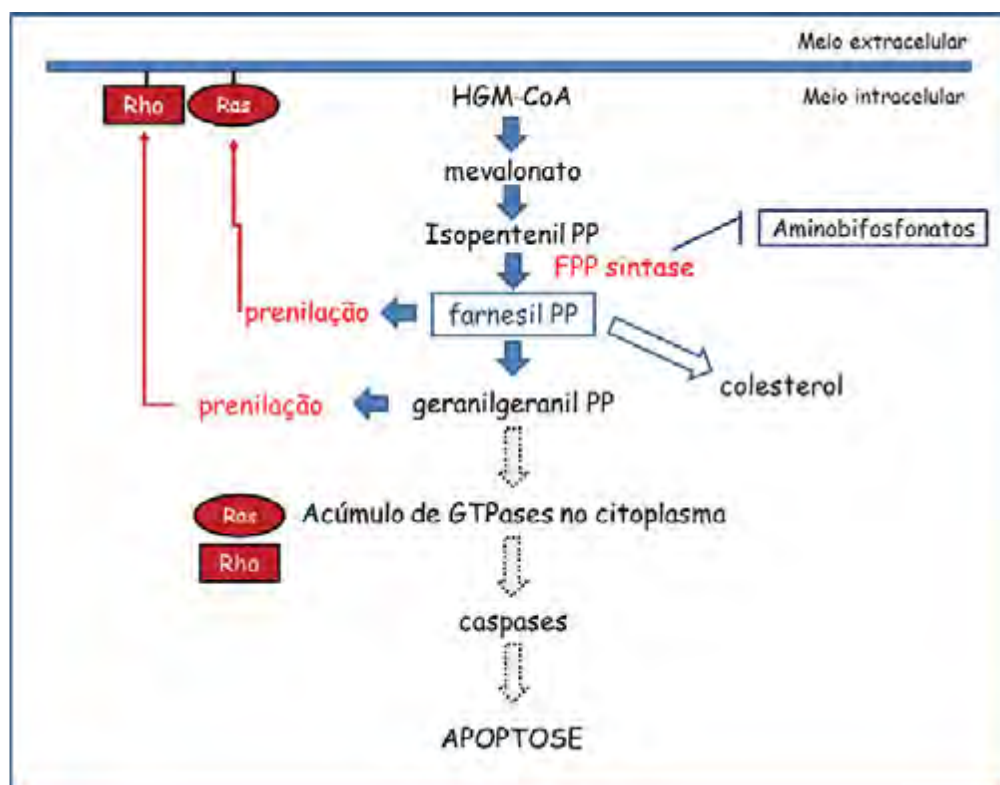


Figura 3 - Os aminobifosfonatos induzem apoptose inibindo a FPP sintase e prevenindo a prenilação de pequenas GTPases. A ausência desse processo resulta na mudança de eventos sinalizadores que alteram a função osteoclástica e induzem à apoptose (Vasconcelos et al., 2004). HGM-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA; PP: difosfato.

Os BFs podem ainda inibir a reabsorção óssea afetando as enzimas necessárias no processo reabsortivo, como a bomba de prótons ATPase vacuolar presente na borda ondulada dos osteoclastos, responsável pela acidificação na lacuna de reabsorção (David et al., 1996).

Outro mecanismo de ação dos BFs é através da inibição da osteoclastogênese pela via RANK/ RANKL/OPG (Kantarci et al., 2006). Ainda, os bifosfonatos simples têm a capacidade de inibir a liberação de mediadores inflamatórios como a TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Takagi et al., 2005), embora alguns estudos mostram que os aminobifosfonatos podem aumentar os níveis dessas citocinas (Sugawara et al., 1998). Funayama et al., 2000, mostraram que o alendronato pode exacerbar a liberação de histamina após indução pelo LPS de *Prevotella intermédia* em mandíbulas de ratos. Dessa forma, o efeito dos BFs no processo inflamatório ainda requer maior elucidação na literatura.

Estudos em cultura de células e em modelos animais têm sugerido que os BFs também podem atuar no processo de formação óssea. Giuliani et al. (1998) mostraram que concentrações menores de alendronato aumentaram a UFC (unidade formadora de colônias) de fibroblastos e osteoblastos em culturas de medula óssea humana e de ratos. Reinholz et al. (2000) através de estudo em osteoblastos fetais, concluíram que o pamidronato não estimulou a multiplicação dessas células, mas ativou sua citodiferenciação (aumento na produção de fosfatase alcalina óssea, colágeno tipo I e proteína óssea total. Im et al. (2004) determinaram que o alendronato e risendronato aumentaram significativamente o número de células osteoblásticas bem como a expressão gênica da BMP-2 (proteína morfogenética-2), colágeno tipo I e osteocalcina.

2.6.2 Aplicação clínica e efeitos adversos dos bifosfonatos

Utilizados no passado como inibidores da calcificação, em doenças como a fibrodisplasia ossificante progressiva, os BFs atualmente são medicamentos amplamente associados ao tratamento de doenças que envolvem perda óssea, como a osteoporose, Doença de Paget, tumores e metástases osteolíticas e hipercalcemia maligna (Lipton, 2008; Silverman, 2008; Landesberg et al., 2009).

A farmacologia clínica dos bifosfonatos é caracterizada por baixa absorção intestinal (1-4%) e dose dependente, porém com alta seletividade ao tecido ósseo. Após administração por via oral, os BFs são rapidamente removidos do plasma pela excreção renal ou pela rápida captação pelo tecido ósseo. Quando o bifosfonato é incorporado ao osso, a meia vida é extremamente longa, para mais de dez anos, relacionando-se com o tempo de *turnover* do sítio esquelético. (Lin et al., 1996; Ganguli et al., 2002). A rápida remoção do plasma e a ligação específica do BF à hidroxiapatita geram poucos efeitos tóxicos sistêmicos. A distribuição desse fármaco para outras partes do corpo é limitada (Adami, Zamberlan, 1996).

A osteonecrose dos maxilares (ONM) é o principal efeito adverso dos BFs com relatos na literatura. Clinicamente, a ONM apresenta áreas de exposição do osso alveolar que ocorre espontaneamente ou torna-se evidente após procedimentos cirúrgicos e persiste após oito semanas (Ruggiero, Mehrotra, 2009). Os mecanismos patogênicos da ONM são incertos, porém especula-se que essa condição pode ocorrer devido à baixa renovação óssea causada pelos bifosfonatos, que leva à redução do fluxo sanguíneo e necrose das células ósseas (Almazrooa, Woo, 2009).

A ONM parece estar mais associada a indivíduos sob tratamento de tumores que recebem BFs mais potentes como o

zoledronato e pamidronato de uso intravenoso (Gebara, Moubayed, 2009). Esses indivíduos, geralmente, estão sob medicamentos quimioterápicos, como imunossupressores, o que também favorece o aparecimento de ONM (Rizzoli et al., 2008). Bamias et al., 2005, investigando 252 pacientes sob terapia oncológica que receberam bifosfonatos, mostraram que apenas 17 (6,7%) desenvolveram ONM. No entanto, a ocorrência de ONM após terapia com os BFs orais mais comuns (alendronato e risendronato) é mais rara. Ruggiero et al., 2004, ao avaliarem 63 pacientes com ONM, relataram que 56 receberam BFs via intravenosa para tratamento de câncer e 7 foram tratados com BFs orais para osteoporose.

De maneira geral, os BFs não alteram as propriedades biomecânicas do osso mesmo com o uso em longo prazo, visto que inúmeros estudos mostram que o tratamento da osteoporose com esses fármacos diminui consideravelmente as fraturas tanto de ossos longos quanto de ossos menores e curtos (Boyce et al., 1995; Harris et al., 1999). A análise histológica de osso em indivíduos que receberam bifosfonato exibe o tecido com aspecto de normalidade a despeito do maior índice de densidade óssea comparado ao placebo (Harris et al., 1999).

Além da ONM, outros efeitos colaterais dos BFs são relatados na literatura, como desconforto gastrointestinal (via oral), toxicidade renal, doenças oculares, resposta de fase aguda, como febre e fadiga, hipocalcemia e hiperparatireoidismo secundário e dores osteomusculares (Papapetrou, 2009).

Existem cerca de 10 diferentes BFs disponíveis comercialmente em diversos países. Para cada um deles existe uma posologia recomendada e uma indicação clínica precisa (Palomo et al., 2006). Para alguns BFs, como o alendronato, pode-se optar pelo uso diário ou semanal via oral. Outros como o pamidronato, a via de aplicação é intravenosa. Já para fármacos mais recentes, como o ibandronato,

recomenda-se dose mensal via oral (Chesnut, 2006). Até os dias atuais, não existe nenhum bifosfonato de ação local registrado comercialmente.

2.6.3 Risendronato de sódio (RS)

O risendronato de sódio, também conhecido por NE-58095 ou ácido risendrônico, é um aminobifosfonato cujo nome químico é 2-hidroxietilideno-2-(3-piridinil)-1,1 bifosfonato dissódico (Crandall, 2001). As características farmacocinéticas do risendronato são semelhantes à de outros bifosfonatos de via oral: baixa absorção intestinal (0,5-3%) e biodisponibilidade de 0,63% em indivíduos saudáveis (Bobba, Adachi, 2007). O fármaco não tem metabolização hepática e a maior parte é rapidamente captada pelo tecido ósseo e o restante é excretado incólume pelos rins. Ainda, devido à união do risendronato aos cristais de hidroxiapatita do osso, à medida que o tecido ósseo sofre remodelação, as moléculas do fármaco são novamente liberadas (Umland, Boyce, 2001).

2.7 Bifosfonatos e Periodontia

2.7.1 Estudos em animais

Weinreb et al., em 1994, estudaram o efeito do alendronato, administrado por via intravenosa, na redução da perda óssea alveolar causada por periodontite experimental em macacos, após as ligaduras em dentes molares inferiores na junção esmalte-cimento e,

subsequente, inóculo com *Porphyromonas gingivalis*. Nos animais que receberam placebo foi observada significativa perda óssea na junção esmalte-cimento e na furca, enquanto no grupo tratado com alendronato (0,05 mg/Kg) houve redução significativa da perda óssea em ambos sítios. Já nos animais tratados com maiores doses, 0,25 mg/kg, os mesmos benefícios não foram encontrados. Os autores sugeriram que alendronato pode reduzir a reabsorção óssea alveolar associada com a periodontite.

Shoji et al. (1995), investigaram o efeito sistêmico do risendronato de sódio na periodontite experimental induzida em ratos. Foram utilizados 40 animais divididos em 4 grupos, sendo um controle (placebo) e os outros 3 de acordo com a dose do fármaco aplicado (0,8 mg/kg; 1,6 mg/kg e 3,2 mg/kg). Após indução da periodontite, o medicamento foi administrado diariamente por 7 dias, na qual os animais foram submetidos à eutanásia. Os resultados mostraram que os grupos tratados com as maiores doses de risendronato apresentaram menor perda óssea e redução do número de osteoclastos.

Reddy et al., em 1995, avaliaram o efeito do alendronato na perda óssea em periodontite induzida por ligaduras, em cães *beagles*, pela análise digital de imagens radiográficas e análise histológica. O alendronato não influenciou os aspectos clínicos de acúmulo de placa e inflamação gengival, mas, no grupo tratado com o BF, observou-se menor mobilidade dentária, maior densidade mineral óssea e menor perda de inserção das fibras gengivais. Os autores concluíram que o alendronato pode ser benéfico no tratamento da perda óssea alveolar associada à doença periodontal.

Em relação aos protocolos terapêuticos, os estudos envolvendo BFs e periodontite são extremamente variados, tanto em relação à dosagem, frequência e via de administração quanto ao objetivo da abordagem medicamentosa, se preventiva ou curativa. Apesar da maioria desses estudos terem sido feito em modelos animais, essa

variabilidade reflete, em parte, a realidade clínica, visto que, essa classe de fármaco não é utilizada primordialmente para o tratamento da doença periodontal, mas como adjuvante ao tratamento de doenças ósseas e cada substância apresenta sua posologia.

Alencar et al., em 2002, se propuseram a avaliar o efeito do clodronato de sódio de forma sistêmica em duas abordagens, profilática e terapêutica. Foram utilizados 72 ratos e divididos em 2 grandes grupos: profilático, na qual foram administrados três diferentes doses diárias de clodronato em cada subgrupo (1, 5 e 25 mg/kg) concomitantemente à indução da periodontite por ligaduras, desde o dia 0 até o dia 7, quando os animais foram sacrificados e terapêutico, na qual após 5 dias da indução da doença, se iniciou a administração do fármaco, na três dosagens supracitadas por 7 dias. Havia também outros dois grupos controle, na qual foi utilizada solução salina nas duas abordagens. Os autores concluíram que ambas as abordagens apresentaram menor perda óssea e que o resultado foi dose dependente.

Resultados semelhantes foram obtidos por Menezes et al., 2005, na qual avaliaram o efeito profilático e terapêutico do alendronato de sódio em três concentrações (0,1 mg/kg, 0,25 mg/kg e 0,5 mg/kg) na perda óssea alveolar decorrente da periodontite experimental em ratos. Tanto a abordagem profilática (início concomitante à indução da doença) quanto a terapêutica (iniciada após 5 dias da inserção da ligadura) foram eficazes na redução da perda óssea comparado aos grupos controle. Ainda, os melhores resultados desse estudo também foram dose-dependente, na qual maiores dosagens mostraram maiores benefícios.

Outros estudos se propuseram a avaliar a duração do tratamento com BFs e a perda óssea alveolar. Tani-Ishii et al., em 2003, investigaram o efeito do uso sistêmico do icadronato (bifosfonato de terceira geração) na periodontite experimental em ratos através de parâmetros inflamatórios, histomorfométricos e radiográficos. Após a

inoculação com de *Porphyromonas gingivalis*, os animais receberam 2 mg/kg de icadronato ou placebo 2 vezes por semana por 2, 4 ou 8 semanas. Os resultados não mostraram diferenças estatísticas entre os grupos em relação à perda óssea alveolar, entretanto, os grupo tratado com o bifosfonato por 8 semanas apresentou maior preservação do ligamento periodontal e menor infiltração de neutrófilos.

Cetinkaya et al., em 2008, avaliaram o efeito do risendronato de sódio na perda óssea alveolar em periodontite experimental em ratos. Cada grupo recebeu um tratamento diferente, de acordo com a dose (0,1 mg/Kg ou 1 mg/Kg) e a duração do tratamento (3 ou 8 semanas). Após análises histomorfométrica, estereológica e radiográfica, os autores concluíram que os grupos tratados com risendronato por 3 semanas foram mais eficazes na inibição da reabsorção óssea comparado com os grupos tratados por longa duração e com os grupos que receberam placebo.

A associação de fármacos ou substâncias com intuito de reduzir o impacto da resposta imunoinflamatória do hospedeiro na perda óssea periodontal tem sido investigada na literatura. Llavaneras et al., 2001, estudaram o efeito do clodronato de sódio isolado ou associado à doxíciclina modificada na expressão gengival de MMPs e na perda óssea periodontal induzida por inoculação de LPS em ratos. A partir do estabelecimento da doença, foram instituídas as seguintes terapias: clodronato de sódio 1 ml uma vez por semana; doxíciclina 1 mg/diário; combinação dos fármacos. Após 7 dias, verificou-se que o tratamento combinado foi o mais efetivo na redução dos parâmetros avaliados.

Em estudo similar, Buduneli et al., em 2005, avaliaram a associação do alendronato de sódio (ALD) e doxíciclina modificada (SDD), ou cada fármaco isolado na prevenção da perda óssea alveolar e nos níveis séricos de IL-1, osteocalcina (OCC) e Proteína C Reativa após inoculação com LPS de *Escherichia coli* em ratos. Os animais foram divididos em 5 grupos distribuídos da seguinte forma: grupo 1-controle;

grupo 2 – LPS + salina; grupo 3 – LPS + SDD (5 mg/kg); grupo 4- LPS + ALD (0,5 mg/kg); grupo 5 – LPS + SDD + ALD. Após 7 dias, os animais foram submetidos à eutanásia e os autores concluíram que os dois grupos tratados com ALD apresentaram menor perda óssea alveolar comparado com o grupo tratado com salina e com SDD apenas, entretanto, a observação dos outros parâmetros mostrou apenas aumento na concentração de osteocalcina pelo grupo SDD+ALD.

Com intuito de observar a interação entre periodontite, deficiência estrogênica e BFs, Duarte et al., em 2006, propuseram estudo em que avaliaram efeito do uso sistêmico do alendronato de sódio (5 mg/kg), estrógeno (20 µg/kg), ou calcitonina (16 IU/kg) na prevenção da perda óssea alveolar em ratas ovariectomizadas. Os animais receberam o tratamento medicamentoso um dia após a ovariectomia por 7 dias quando sofreram eutanásia. Os resultados mostraram que a deficiência estrogênica reduziu a densidade do osso de suporte dental e que tanto o estrógeno quanto o alendronato foram capazes de inibir esse processo.

Os trabalhos supracitados analisam a atividade anti-reabsortiva dos BFs de uso sistêmico na periodontite experimental em ratos. Apesar da maioria dos estudos mostrarem certos benefícios quando comparado a placebos, após análise crítica dos resultados, observa-se muitas vezes melhoras não significantes. Isso em parte pode ocorrer pela própria farmacocinética dos BFs, que como visto, na sua grande parte é discretamente biodisponibilizado e incorporado de forma irregular nos cristais de hidroxiapatita do tecido ósseo (Fernandes, 2005; Nobre et al., 2008). Alguns autores também afirmaram que esses fármacos podem ter uma resposta bifásica, dependendo da dose e da intensidade. Dessa forma, alguns pesquisadores têm investigado o efeito da aplicação local dos BFs em defeitos ósseos, principalmente os causados pela periodontite. Essa abordagem terapêutica apresenta potencialmente maior capacidade de incorporação das moléculas do

fármaco nos tecidos ósseos periodontais, além de reduzir os efeitos indesejáveis e colaterais observados na terapia sistêmica

Os pioneiros estudos envolvendo aplicação local em defeitos ósseos periodontais foram realizados a partir do estudo inicial de Yaffe et al., em 1995, na qual avaliaram o efeito do uso local e sistêmico do alendronato em defeitos ósseos alveolares produzidos pelo deslocamento do retalho mucoperiosteal de espessura total (RMP). O alendronato foi aplicado topicamente nas doses de 0,15, 0,75 e 1,5 mg/ml sob retalhos mucoperiosteais nas mandíbulas de ratos ou por via intravenosa na dose de 0,5 mg/Kg de peso. Os autores perceberam que o uso tópico do alendronato não gerou efeito sobre o RMP, no entanto, quando aplicado de modo intravenoso, houve a redução estatisticamente significativa na reabsorção óssea mandibular.

Posteriormente, Yafee et al., 1997, avaliaram o efeito do alendronato aplicado topicamente através de uma esponja cirúrgica embebida (20 mg/ml) sobre a superfície do osso exposto, após a execução de um RMP em mandíbulas de ratos, no intuito de inibir a reabsorção óssea induzida. Os autores constataram que o alendronato liberado localmente reduziu significativamente a reabsorção óssea ativada pela cirurgia de retalho, sugerindo a aplicação do alendronato nessas situações.

Binderman et al., 2000, estudaram a ação local e a distância do alendronato sobre o processo de reabsorção óssea que ocorre após RMP, em ratos. Num primeiro grupo, após o deslocamento do retalho e exposição óssea, o medicamento foi aplicado topicamente com o auxílio de uma esponja cirúrgica embebida com a droga nas concentrações de 10, 50, 200 ou 400 µg/mL. No segundo grupo, a esponja embebida com alendronato nas concentrações de 50, 200 ou 400 µg/mL foi posicionada na submucosa da bochecha numa região distante e no lado oposto a do sítio cirúrgico. Após análise das imagens radiográficas, os autores concluíram que a aplicação tópica nas duas

maiores concentrações de alendronato foi significativamente efetiva na redução da perda óssea alveolar local e, que na concentração de 400 µg/mL, o BF apresentou efeito sistêmico, reduzindo a reabsorção óssea distante do local da cirurgia.

Yaffe et al., em 2000, avaliaram, através de semelhantes metodologias anteriores, o efeito do uso local de 6 tipos diferentes de bifosfonatos, incluindo o alendronato, etidronato e outros quatro contendo nitrogênio em cadeia cíclica, desenvolvido pelo próprio laboratório, que foram denominados pelas siglas VS-5, VS-6, ISA-13 e SuBP. Após análises radiográficas, foi constatado que o alendronato foi o mais eficaz na prevenção da perda óssea, seguido pelo ISA-13, VS-5 e VS-6, que por sua vez apresentaram resultados superiores que o etidronato e o SuBP.

Mitsuta et al., 2002, examinaram a ação local do clodronato na periodontite experimental induzida em ratos através da inserção de um anel elástico. Dois dias após a indução da doença, aplicou-se 50 µL de clodronato em três diferentes concentrações (20, 40 ou 60 mM) na submucosa palatina adjacente a região interdental entre o primeiro e o segundo molar e no lado oposto foi aplicado solução salina. Os resultados das análises radiográficas mostraram que os grupos tratados com 40 e 60 mM preservaram maiores quantidades de osso alveolar e obtiveram maiores índices de densidade óssea. A análise quantitativa da TRAP mostrou redução no número de osteoclastos dos grupos tratados com clodronato em relação ao grupo tratado com salina.

Recentemente, Goya et al., em 2006, avaliaram o efeito da irrigação subgengival com 100 µL de olpadronato a 150 mM nos dentes na qual foi induzido a periodontite pela inserção de ligaduras. Foram selecionados 20 animais divididos em dois grupos, de acordo com a terapia adotada, irrigação com clodronato ou solução salina. A aplicação foi iniciada um dia após a indução da periodontite e foi repetida diariamente por 4 dias, na qual os animais foram submetidos à eutanásia.

A análise histológica e histomorfométrica mostraram que os grupos tratados com olpadronato exibiram menor perda óssea inter-radicular e os osteoclastos exibiram sinais de alteração, como perda da borda ondulada, redução da adesão ao tecido ósseo e formato arredondado.

2.7.2 Estudos em humanos

Os BFs são uma classe de medicamentos cuja principal função é inibir a reabsorção óssea oriunda de processos fisiopatológicos. Não obstante, existem diversas substâncias com sua posologia adequada para cada situação clínica e cuja eficácia está comprovada por inúmeros estudos científicos e também ainda submetida à análise por instituições reguladoras. Em periodontite, as pesquisas preliminares em animais mostram resultados animadores, entretanto, não é possível extrapolar esses dados para o tratamento em humanos. Ainda, poucos estudos clínicos controlados por placebo e duplo cego existem na literatura envolvendo o uso de bifosfonatos como auxiliar ao tratamento da periodontite.

Rocha et al., em 2001, avaliaram o efeito do alendronato (10 mg/dia por 6 meses) como adjunto ao tratamento periodontal em indivíduos diabéticos. Foram selecionados 40 pacientes, sendo 20 homens e 20 mulheres, divididos aleatoriamente em dois grupos, sendo um tratado com alendronato e outro com placebo. Todos os indivíduos receberam RAR, orientação de higiene e foram monitorados por 6 meses. Os resultados mostraram que ambos os grupos exibiram melhora nos parâmetros clínicos periodontais, sem haver diferenças estatísticas significantes. Análise por subtração radiográfica mostrou que o grupo tratado apresentou maior redução da distância entre a junção cimento-esmalte e a crista óssea alveolar.

El-Shinnawi e El-Tantawy, em 2003, avaliaram o efeito do Fosamax® (alendronato, 5 mg/diário) através de parâmetros clínicos periodontais e radiográficos como adjunto ao tratamento periodontal em indivíduos com periodontite crônica. Vinte e quatro pacientes foram divididos em dois grupos, tratado e controle, e receberam terapia periodontal inicial e foram acompanhados por 6 meses. Ao final do estudo, não foram observados diferenças estatísticas nos parâmetros clínicos, entretanto, no grupo que recebeu alendronato, foi observado aumento da densidade mineral óssea mandibular comparada com grupo que recebeu placebo.

Rocha et al., 2004, investigaram o efeito do uso sistêmico do alendronato associado ao tratamento mecânico convencional em 40 mulheres pós-menopausa, obesas e não obesas, através de parâmetros clínicos periodontais, níveis hormonais, densidade mineral óssea do calcâneo e de níveis sorológicos de telopeptídeos N (NTx) e de fosfatase alcalina óssea. Após seis meses, os autores concluíram que os indivíduos que receberam alendronato, tanto obesos, quanto não obesos, mostraram benefícios tanto clínicos, tais como profundidade de bolsa, nível de inserção, mobilidade dental e também nos níveis sorológicos dos marcadores ósseos.

Lane et al., 2005, estudaram o efeito de dois BFs, o alendronato (10 mg/dia) e o risendronato (5 mg/kg) como adjunto ao tratamento mecânico periodontal em 66 indivíduos, sendo 37 homens e 29 mulheres. Após um ano de acompanhamento, os resultados mostraram que os grupos tratados com BFs apresentaram maior redução da profundidade de bolsa e sangramento a sondagem comparado ao grupo placebo significante estatisticamente. Essa melhora foi observada principalmente entre os períodos de 6 a 12 meses do tratamento periodontal inicial. A comparação entre os fármacos não mostrou diferenças estatísticas.

Jeffcoat et al., 2007, investigaram, através de estudo duplo-cego, paralelo, randomizado e controlado por placebo, o efeito do alendronato (70 mg/semana) associado ao tratamento mecânico periodontal (RAR) e acompanhamento (manutenção periodontal) por 24 meses em 335 indivíduos, sendo 162 homens e 173 mulheres. Não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre os grupos ao final do estudo, entretanto, no subgrupo de indivíduos que apresentavam menor densidade mineral óssea no início do estudo, o tratamento adjunto com alendronato foi mais efetivo que o placebo na redução da profundidade de bolsa e ganho de inserção clínica.

Recentemente, Graziani et al., 2009, avaliaram através de estudo cego e randomizado, o efeito da terapia sistêmica por 3 meses com neridronato adjunto ao tratamento periodontal convencional. Após 6 meses de acompanhamento não observaram diferenças significantes comparado com o placebo nos parâmetros clínicos periodontais.

Nos estudos citados, observa-se que não houve restrição de inclusão apenas de indivíduos que inicialmente apresentavam certo grau de osteopenia ou osteoporose e o tratamento com BFs foi exclusivo para o tratamento periodontal. Isso em parte pode ser explicado porque ainda não existem comprovações científicas entre a relação da osteoporose com aumento da perda óssea alveolar na periodontite (Jeffcoat et al., 2000). Dessa forma, ainda há a necessidade de maior aprofundamento nesses estudos, principalmente no que se refere em quais indivíduos, ou em quais padrões de periodontite podem se beneficiar da terapia com bifosfonatos.

Em relação aos estudos envolvendo a aplicação local, Reddy et al., em 2005, desenvolveram um gel a base de carbopol contendo alendronato e avaliaram sua efetividade através de propriedades de viscosidade e análises *in vitro* e *in vivo*. Ao término das investigações, concluiu-se que o gel desenvolvido apresentou boas propriedades clínicas, como compatibilidade entre o polímero e o

fármaco. Em relação ao estudo *in vivo*, o gel contendo o BF mostrou-se mais efetivo na redução da profundidade de bolsa.

Diante dessas evidências, os objetivos desse estudo são avaliar os efeitos da aplicação local do risendronato, bem como elucidar a melhor dose resposta e o papel de múltiplas aplicações.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência da aplicação local, única ou dupla, com diferentes concentrações de risendronato de sódio na inibição da perda óssea alveolar decorrente da periodontite experimental em ratas, por meio de análises histológica, histomorfométrica, imuno-histoquímica e enzimo-histoquímica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizadas 48 ratas adultas (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, Wistar) fornecidas pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP. As ratas foram acondicionadas, durante todo experimento, em gaiolas coletivas à temperatura ambiente, recebendo ração e água *ad libitum*. Este trabalho foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP sob protocolo nº08/2009-PA/CEP (Anexo A).

4.2 Delineamento dos grupos

Os 48 animais foram divididos em 2 grupos constituídos por 24 animais: GD (dupla aplicação) e GU (única aplicação). Os dois grupos foram subdivididos em 8 subgrupos: R1 (duas aplicações de 0,125 mg de risendronato), R2 (duas aplicações de 0,25 mg de risendronato), R3 (duas aplicações de 0,5 mg de risendronato) e A1 (duas aplicações de água destilada); R4 (uma aplicação de 0,125 mg de risendronato), R5 (uma aplicação de 0,25 mg de risendronato), R6 (uma aplicação de 0,5 mg de risendronato) e A2 (uma aplicação de água destilada). Foi induzida

a periodontite pela confecção de ligaduras ao redor dos primeiros molares inferiores direitos em todos os animais. Nos grupos A1 e A2, os molares contralaterais serviram de controles (C1 e C2) sem ligadura. O quadro 1 exibe o delineamento experimental dos grupos e subgrupos.

Quadro 1 - Delineamento experimental dos grupos

GD (duas aplicações)	Indução de periodontite e risendronato (0,125 mg) (n=6)	R1
	Indução de periodontite e risendronato (0,25 mg) (n=6)	R2
	Indução de periodontite e risendronato (0,5 mg) (n=6)	R3
	Indução de periodontite e água destilada (n=6)	A1
	Sem indução de periodontite experimental (contralateral)	C1
GU (uma aplicação)	Indução de periodontite e risendronato (0,125 mg) (n=6)	R4
	Indução de periodontite e risendronato (0,25 mg) (n=6)	R5
	Indução de periodontite e risendronato (0,5 mg) (n=6)	R6
	Indução de periodontite e água destilada (n=6)	A2
	Sem indução de periodontite experimental (contralateral)	C2

4.3 Indução da periodontite

Previamente a colocação das ligaduras, os animais foram anestesiados, empregando-se solução contendo 13 mg de cloridrato de xilasina a 2% (Rompun-Bayer® do Brasil), medicamento sedativo e relaxante muscular, e de 33 mg ketamina base (Dopalen® – Agribands do Brasil), anestésico geral.

A indução da periodontite foi realizada por meio da confecção de ligadura ao redor do primeiro molar inferior direito. Tal

procedimento consiste na inserção de um fio de algodão número 20 ao redor da região cervical do dente, sendo realizadas duas voltas e posterior amarra do fio junto à face mesial do dente (Figura 4). Nos subgrupos A1 e A2, os dentes contralaterais serviram como controle, sem doença (C1 e C2). A ligadura permaneceu por um período de quinze dias, momento no qual todos os animais foram submetidos à eutanásia.

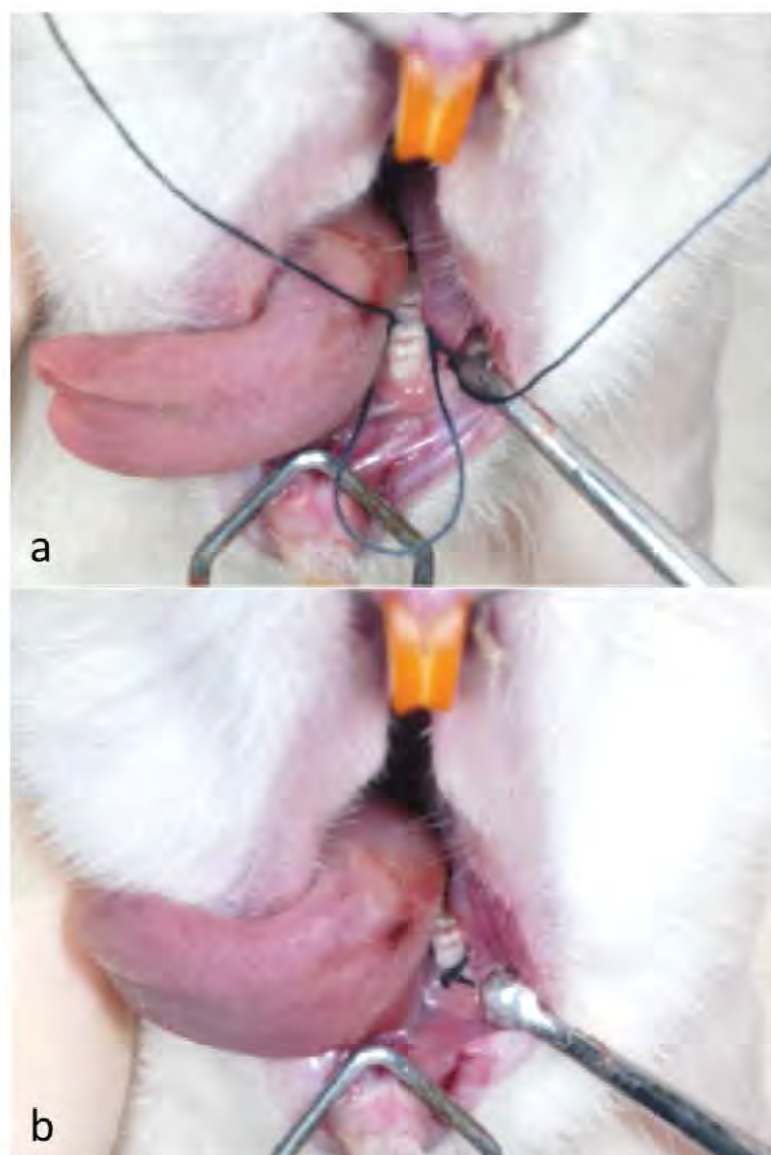


Figura 4 – Procedimento de indução da periodontite. a) inserção de ligadura em primeiro molar inferior; b) procedimento finalizado, com o nó localizado na mesial.

4.4 Preparação do fármaco e tempos de aplicação

O fármaco utilizado para aplicação local foi o risendronato de sódio, na forma de solução aquosa. Para testar uma possível influência apenas da ação mecânica da irrigação, em dois grupos de ratas foi aplicado apenas água destilada (veículo) sem o bifosfonato (A1 e A2).

A menor dosagem do risendronato testada, 0,125 mg, foi baseada na equivalente empregada em humanos para uso semanal: 35 mg se considerarmos 70 kg de massa para humanos e convertida para a massa média das ratas na idade estudada (aproximadamente 200 a 250 g). Outras duas doses correspondentes ao dobro e ao quádruplo dessa concentração inicial foram incluídas. Dessa forma, as concentrações utilizadas foram de 0,125, 0,25 e 0,5 mg de risendronato por 100 µl de água destilada.

Após anestesia dos animais, a aplicação local da solução foi feita com auxílio de seringas (1 ml) e agulhas e foi aplicado 100 µl uniformemente dentro do sulco gengival, sendo 50 µl por vestibular e 50 µl por lingual (Figura 5). Para minimizar a deglutição da solução pelos animais, concomitantemente a irrigação foi feito a secagem local com algodão posicionado em pinça clínica.

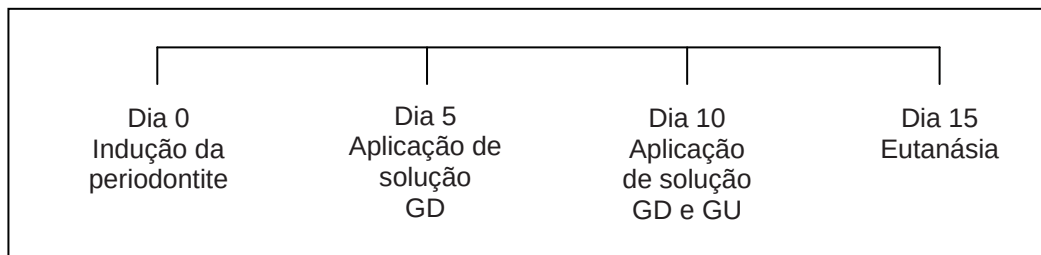


Figura 5 - Aplicação subgengival do medicamento.

Foram feitas duas aplicações do medicamento, após 5 e 10 dias da indução da periodontite nos animais do Grupo GD e uma aplicação após 10 dias nos animais do Grupo GU (Quadro 2). A administração do fármaco seguiu a distribuição dos subgrupos experimentais abaixo:

- a) R1 e R4: irrigação de 100 μ L de solução contendo 0,125 mg de risendronato de sódio;
- b) R2 e R5: aplicação de 100 μ L de solução contendo 0,25 mg de risendronato de sódio;
- c) R3 e R6 aplicação de 100 μ L de solução contendo 0,5 mg de risendronato de sódio;
- d) A1 e A2: aplicação de água destilada.

Quadro 2 - Delineamento experimental de acordo com o período de observação adotado.



4.5 Eutanásia dos animais

Após 15 dias da colocação das ligaduras, todos os animais foram anestesiados e posteriormente submetidos à eutanásia por perfusão de formol a 4 %. A seguir as mandíbulas foram removidas, o tecido mole excedente eliminado e o material fixado em formol a 10% por um período mínimo de 48 horas para posterior análise histológica, histomorfométrica, imuno-histoquímica e enzimo-histoquímica.

4.6 Processamento histológico

As mandíbulas foram descalcificadas em solução aquosa de ácido etilenodinitrilo tetra-acético-sal dissódico dihidratado (EDTA – Titriplex® P.A – Merck- Kga A, Darmstadt, Alemanha) na concentração de 10%. Em seguida, as peças foram processadas para inclusão em parafina com a face lingual dos dentes paralela ao plano de corte. Para esse estudo, foram obtidos 10 cortes seriados no sentido méso-distal na região da furca. Os cortes foram realizados a partir do momento em que a raiz médio-lingual foi totalmente removida, permitindo a visualização da furca

entre as raízes mesial e distal do primeiro molar inferior. Dos 10 cortes obtidos, 2 foram cortados com 3 µm de espessura e encaminhados para análise imuno-histoquímica. Dos 8 restantes com 5 µm de espessura, 6 cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para análise histológica e histomorfométrica e 2 cortes foram encaminhados para análise enzimo-histoquímica (TRAP). O Quadro 3 exibe a distribuição dos cortes por cada bloco obtido.

Quadro 3 - Distribuição dos cortes e das análises correspondentes de acordo com a profundidade.

Profundidade	Análise	Profundidade	Análise
Corte 1	Imuno	Corte 6	Imuno
Corte 2	HE	Corte 7	HE
Corte 3	TRAP	Corte 8	TRAP
Corte 4	HE	Corte 9	HE
Corte 5	HE	Corte 10	HE

Para evitar campos semelhantes na análise em HE, entre os cortes 4/5 e 9/10, o material foi aprofundado em 15 µm.

4.6.1 Análise histológica

Foram analisados qualitativamente os cortes histológicos corados por HE sendo observados aspectos como presença e extensão de infiltrado inflamatório, vascularização, extensão do ligamento periodontal, espessura do cemento e áreas de reabsorção radicular, áreas de reabsorção e neoformação óssea e os espaços medulares. As descrições feitas em todos os grupos foram realizadas por um único examinador cego.

4.6.2 Análise histomorfométrica

Para a histomorfometria foi utilizado um retículo composto por oitenta pontos resultantes das intersecções entre linhas verticais (8) e horizontais (10), posicionado sobre a imagem histológica para a quantificação do volume trabecular (Vt). Esse parâmetro consiste no volume ocupado pelo osso trabecular, mineralizado ou não, expresso como porcentagem do volume ocupado pela matriz óssea.

O volume trabecular foi medido em dois campos da furca. O Vt do osso inter-radicular da área da furca (VtF) tomando-se por base o teto da furca, de forma que o retículo ficasse entre a furca e a crista óssea (Figura 6 - 1). No segundo campo, tomou-se por base a crista óssea remanescente, de modo que toda a área do retículo fosse preenchida pelo osso alveolar (VtC - 2) (Figura 6).

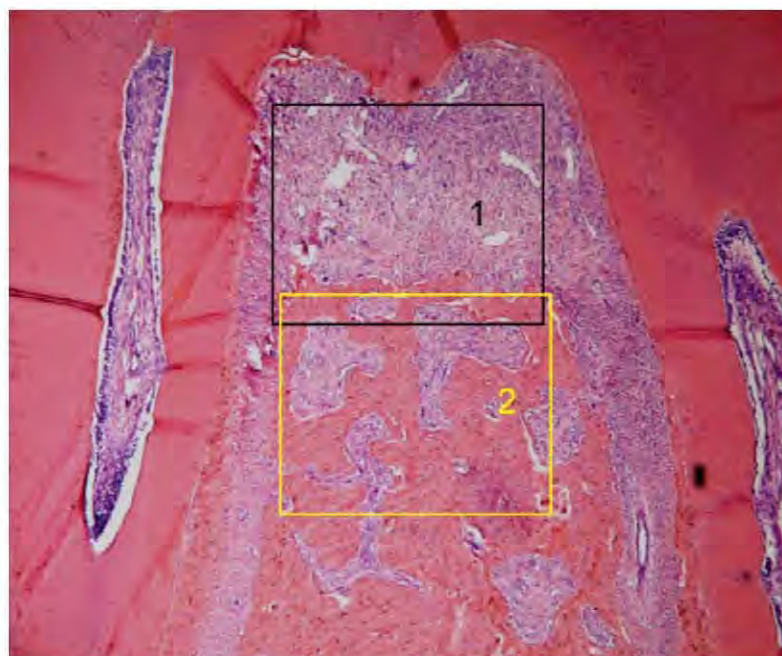


Figura 6 - Corte ilustrando as duas áreas analisadas pela inserção do retículo quadriculado e mensuração do volume trabecular (HE, aumento original de 50x).

O retículo foi confeccionado empregando-se o programa *Image J*, de domínio público (NIH) sobre imagens obtidas em aumento de 100 vezes (Figuras 7 e 8).

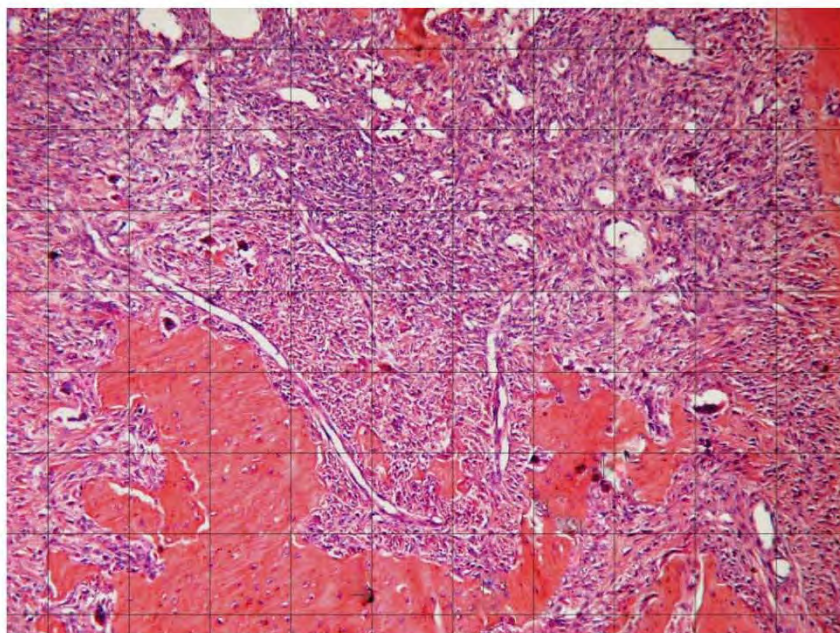


Figura 7 - Retículo quadriculado inserido na imagem obtida no 1º campo para análise do VtF (HE, aumento original de 100x).

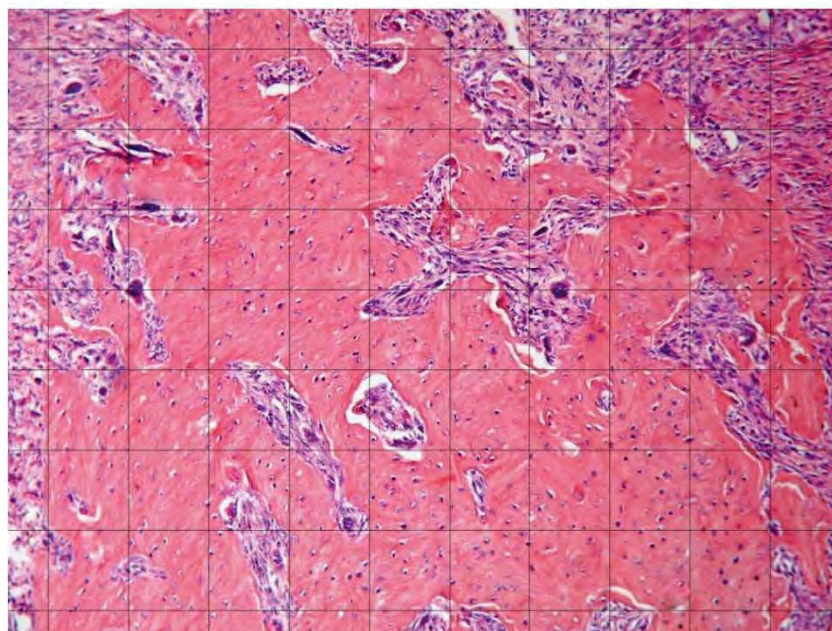


Figura 8 - Retículo quadriculado inserido na imagem obtida no 2º campo para análise do VtC (HE, aumento original de 100x).

Outra análise histomorfométrica obtida foi a distância linear do teto da furca a crista óssea inter-radicular (DL). Para tanto, foi utilizando o programa *Adobe Fireworks*. Para essa medida, foi traçada uma reta tangente ao ponto mais apical da furca e a partir dessa reta foram traçadas 5 linhas perpendiculares equidistantes até a crista óssea inter-radicular (Figura 9). Dessa forma foram formadas 5 medidas lineares por corte entre a furca e osso inter-radicular. Para cada corte foi calculado uma média entre as cinco medidas e posteriormente a média de cada animal e a média do grupo. Ao final, a medida em *pixels* foi convertida em micrômetros com auxílio de uma escala que foi fotografada no mesmo aumento na qual foram obtidas as imagens para esse parâmetro (50x).

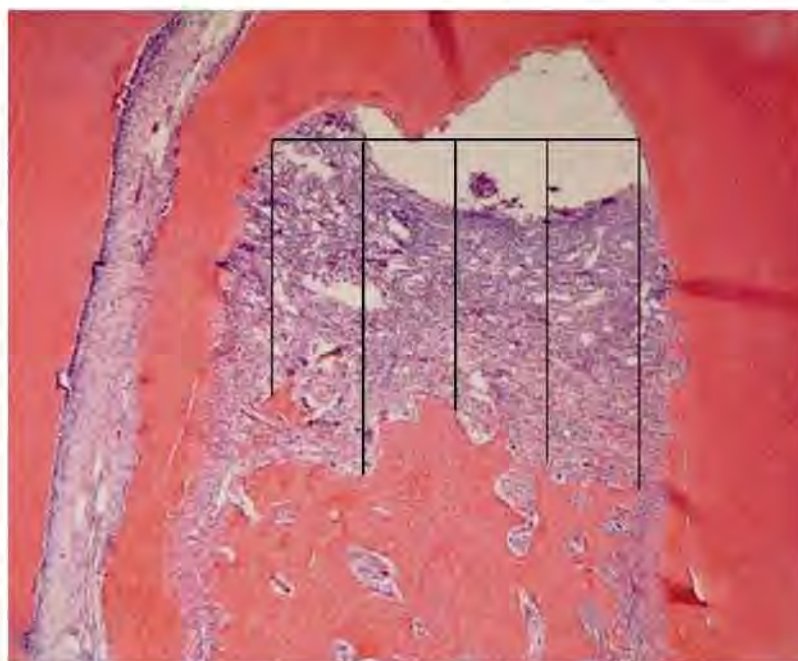


Figura 9 - Esquema de mensuração linear da altura do osso inter-radicular (DL). (HE, aumento original de 50x).

As imagens foram obtidas, por meio de câmera digital microscópio de luz Zeiss Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) que as transmitiu para o programa *Axiovision Release 4.7.2*.

4.6.3 Análise imuno-histoquímica

Para avaliação qualitativa da imunolocalização da proteína osteocalcina, os cortes histológicos após desparafinização em xilol e reidratação em série decrescente de etanol, seguiram os passos descritos abaixo:

- a) eliminação de pigmentos formólicos pelo tratamento em hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°;
- b) lavagem em água corrente por 10 minutos, seguido de duas passagens em água destilada;
- c) incubação com peróxido de hidrogênio (20 volumes) e álcool metílico na proporção 1:1, em dois ciclos de 5 minutos cada, com o objetivo de bloquear a peroxidase endógena tecidual;
- d) lavagem em água corrente por 10 minutos, seguido de duas passagens em água destilada, e imersão por duas vezes em tampão Tris hidroximetil amino metano, (pH 7,4), durante cinco minutos cada;
- e) incubação com soro albumina bovina (BSA) por 1 hora, em câmara úmida, para eliminação dos anticorpos inespecíficos;
- f) incubação com o anticorpo primário diluído em tampão Tris acrescido de soroalbumina bovina (BSA) a 1%.

O anticorpo primário utilizado foi a osteocalcina (Santa Cruz Biotechnology[®]), na diluição 1:300 e incubação a 4° C, *overnight* e recuperação antigênica com citrato em forno de micro-ondas, em 2 ciclos de 5 minutos na potência 7.

Todos os procedimentos a seguir foram precedidos de duas lavagens em Tris (pH 7,4), durante cinco minutos cada:

- a) incubação com o anticorpo secundário biotinilado (DAKO[®] LSAB kit, Peroxidase, California, USA), por 30 minutos à temperatura ambiente;
- b) lavagem ;
- c) exposição ao complexo terciário streptavidina-biotinaperoxidase (DAKO[®] LSAB kit, Peroxidase, California, USA), por 30 minutos à temperatura ambiente;
- d) lavagem;
- e) revelação da reação com diaminobenzidina (DAB) (DAKO[®] CO., California, USA) por 10 minutos;
- f) lavagem em água corrente e água destilada;
- g) contra-coloração com hematoxilina de Mayer por dois minutos;
- h) desidratação em cadeia ascendente de etanol até etanol absoluto;
- i) diafanização em xilol;
- j) montagem em Permount[®] (Fischer Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA).

O Controle positivo utilizado foi a observação de marcação de megacariócitos da medula óssea das mandíbulas (Tera, 2010).

A mensuração da imunomarcação das estruturas foi realizada por imagens com aumento de 400x obtidas partir de um microscópio de luz Axiophot 2 (Carl Zeiss®, Oberkochen, Alemanha) que as transmite para o programa *Axiovision Release 4.7.2*.

Para todos os grupos, classificou-se a intensidade da imunomarcação das estruturas e células pré-definidas como sendo ausente (-), discreta (+), moderada (++) e intensa (+++) (Lekic et al., 1996; Ivanovski et al., 2000; Ivanovski et al., 2001; Silvestrini et al., 2005; Adeyemo et al., 2008; Kim et al., 2009; Tera, 2010).

Foram analisadas na região inter-radicular as seguintes estruturas: tecido conjuntivo pulpar, odontoblastos, matriz cementária, cementoblastos, cementócitos, fibras colágenas do ligamento periodontal, fibroblastos, endotélio, tecido conjuntivo medular, matriz óssea madura, matriz osteóide, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.

As identificações e classificações das imunomarcações foram realizadas por um único examinador cego. Para a calibração foram selecionadas 30 imagens ao acaso e duas mensurações foram feitas num intervalo de 30 minutos. Durante a calibração, foi mensurado aplicou-se o teste *Kappa*, de variabilidade intra-examinador (Cohen, 1968; Landis, Koch, 1977).

4.6.4 Análise enzimo-histoquímica

Para marcação da atividade da TRAP, foi utilizado o *Kit Acid Phosphatase Leukocyte* (Sigma-Aldrich®, St.Louis, MO, USA), seguindo os seguintes passos recomendados pelo fabricante:

- a) preparo da solução de fixação: 25 ml de solução de citrato, 65 ml de acetona e 8 ml de formaldeído 8%;
- b) imersão das lâminas na solução de fixação por 30 segundos e posterior lavagem em água deionizada;
- c) preparo de 2 soluções contendo em cada tubo de ensaio 0,5 ml de solução base de granada GBC e 0,5 ml de nitrito de sódio;
- d) preparo das soluções A e B em diferentes recipientes contendo em cada: 45 ml de água deionizada pré-aquecida a 37 °C, 1 ml da solução descrita no passo anterior, 0,5 ml de solução de fosfato AS-BI naftol, e 2 ml de solução de acetato;
- e) adição de 1 ml de solução de tartarato no recipiente B;
- f) imersão das lâminas nos recipientes aquecidos a 37 °C em banho-maria por 1 hora, sendo que das 2 lâminas obtidas de cada animal uma foi inserida no recipiente A e outra no B;
- g) duas passagens em água deionizada;
- h) contra-coloração com hematoxilina de Gill número 3 por 2 minutos;
- i) lavagem em água corrente por 5 minutos;
- j) secagem em temperatura ambiente;
- k) montagem em Permount® (Fischer Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA).

Nas lâminas obtidas após imersão na solução B (contendo tartarato), as células precursoras de osteoclastos

(mononucleadas) e os osteoclastos (multinucleadas) corados em púrpura foram quantificados.

A quantificação das células TRAP-positivas no periodonto do primeiro molar inferior foi realizada em imagens obtidas em 3 campos com aumento de 400x obtidos na crista óssea inter-radicular, de modo que não houvesse sobreposição de imagens. Após identificação, as células foram contadas, considerando tanto os pré-osteoclastos (mononucleados) quanto os osteoclastos (multinucleados). Os valores foram expressos somando-se o número de células TRAP-positivas por campo do periodonto em cada animal.

Essa contagem foi realizada por um único examinador cego e calibrado. Para a calibração escolheu-se 36 campos aleatoriamente de 12 animais e foram feitas duas contagens com intervalo de meia hora entre elas. Depois de obtidos os dois valores, calculou-se o erro técnico de medição relativo, ETM (%) ou coeficiente de variação percentual (CV), através da seguinte fórmula: $CV\% = \text{ETM (erro técnico de medição absoluto)} / \text{MG (média geral)} \times 100$ ou $CV\% = [\sqrt{(\sum d^2 / 2n)} / \text{MG}] \times 100$, na qual d é diferença entre as medidas e n é o numero total de mensurações (Perini et al., 2005; Harris, Smith; 2009).

4.7 Análise estatística

Os dados obtidos da análise histomorfométrica e enzimo-histoquímica foram tabulados e analisados de forma descritiva e inferencial.

A variável resposta ou dependente foi a influência da concentração do fármaco na evolução da periodontite nas ratas em cada uma das seis condições experimentais, além da comparação com os dois

grupos controles positivos (A1 e A2) e com os grupos controles negativos (C1 e C2).

Obteve-se 60 valores para cada parâmetro, os quais foram submetidos à análise estatística por meio dos programas computacionais: *MINITAB* (Minitab, version 14.12, 2004) e *STATISTIX* (Analytical Software Inc., version 8.0, 2003).

Foi efetuado para cada variável dependente, separadamente, a estatística descritiva (média e desvio padrão) e inferencial. Inicialmente, para comparação dentro de cada grupo, GD e GU, utilizou-se o teste ANOVA e *post hoc Dunnet*, para comparação dos grupos testes com os controles. Para comparação dos subgrupos tratados entre si foi aplicado o teste ANOVA e o teste de comparação múltipla de *Tukey*. O nível de significância adotado foi o valor convencional de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Análise histológica descritiva

5.1.1 Controle sem doença (C1 e C2)

Os cortes histológicos exibiam fragmentos de mandíbula contendo o primeiro, segundo e terceiro molares em ordem decrescente de tamanho e parte da raiz do incisivo. Os molares eram constituídos na porção coronária por dentina tubular e contornados por espaço claro correspondente ao esmalte que foi removido pelo processo de descalcificação. Na porção radicular, o cimento revestia toda a raiz, além da região de furca, sendo do tipo acelular até o terço médio e a partir desta região até o ápice do tipo secundário ou celular.

A polpa era formada por tecido conjuntivo frouxo, células fusiformes e estelares, substância fundamental amorfa abundante, numerosos vasos sanguíneos e feixes nervosos. Uma nítida camada de odontoblastos na periferia da polpa pôde ser observada em contato com a pré-dentina. Estas células apresentavam formato alongado na porção coronária, enquanto na porção radicular eram cúbicas ou achatadas. Subjacente a camada odontoblástica encontrou-se um tecido conjuntivo frouxo, com abundante substância amorfa entre células fusiformes e vasos sanguíneos, por vezes congestos, e fibras nervosas. Os cornos pulparem acompanhavam a anatomia externa da coroa, havendo um estreitamento na região central da câmara pulpar.

Na região interdental, como os tecidos gengivais foram removidos para futura análise, não se observou tanto o epitélio juncional e sulcular quanto grande parte do tecido conjuntivo subepitelial. Algumas fibras colágenas organizadas foram observadas, principalmente as trans-septais e as dentoperiostais, outras pareciam não ter orientação definida.

O ligamento periodontal apresentou fibras colágenas geralmente bem organizadas, inserindo-se no osso que revestia a parede do alvéolo dentário e no cimento. (Fibras de Sharpey). As células observadas no ligamento periodontal foram: cementoblastos, células cúbicas que revestiam o cimento radicular, fibroblastos, ora cuboide ora fusiformes e osteoblastos na margem óssea do ligamento (Figura 11a).

As cristas ósseas possuíam o topo arredondado, não exibindo sinais de reabsorção sendo que na maioria dos cortes a crista mesial estava localizada mais apicalmente que a crista distal. Tanto nas cristas, quanto no osso alveolar inter-radicular, as características ósseas foram semelhantes. O osso apresentava algumas características de osso compacto, exibindo aspecto denso, com canais de Havers circundados por osteócitos e outras de osso trabecular, na qual eram vistos espaços medulares de tamanho variados (Figura 10a). Áreas de reabsorção óssea, notada pela superfície óssea irregular, contendo, por vezes, células gigantes multinucleadas semelhantes a osteoclastos. Tais células exibiam formatos ora mais alongado, ora mais arredondado e com múltiplos núcleos bem arredondados e hipercromáticos, alojadas em lacunas de Howship (Figura 11c). Os osteoblastos circundavam o osso alveolar e os espaços medulares, alguns mais volumosos e cuboide e outros mais achatados, dispostos lado a lado (Figura 11b). Foi possível observar áreas de matriz osteoide, que eram áreas claras que indicam neoformação óssea. Linhas reversas basofílicas, indicativas de remodelação óssea foram observadas. Na matriz óssea madura foram notados osteócitos, algumas vezes com núcleos volumosos, outros vacuolizados e picnóticos, centralizados ou não nas suas lacunas. Os

espaços medulares próximos à crista óssea apresentaram tecido conjuntivo frouxo, com fibras colágenas, vasos sanguíneos e osteoblastos cúbicos e achatados. Nas regiões mais apicais os espaços eram amplos e continham medula óssea, sendo possível observar alguns megacariócitos.

5.1.2 Grupos A1 e A2 (com ligadura e placebo)

No que se refere à dentina e a polpa dental, as características histológicas dos cortes permaneceram as mesmas, com exceção de uma maior presença de infiltrado inflamatório mononuclear e congestão vascular nos tecidos pulpare dos primeiros molares. Em alguns espécimes observaram-se áreas de infiltrado inflamatório crônico periapical.

Na área da furca, notaram-se áreas de reabsorção cementária e dentinária caracterizada pelo aspecto irregular e por vezes, presença de colônias bacterianas aderidas e não aderidas. Em alguns espécimes foi possível observar fragmentos de sequestros ósseos, apresentando tecido ósseo necrosado com osteoplastos vazios e circundados por massas de colônias bacterianas (Figuras 10b e 11e). O defeito periodontal foi preenchido por um tecido conjuntivo frouxo, edemaciado, com fibras colágenas orientadas em varias direções, com escassas células inflamatórias e vasos sanguíneos. Em grande parte dos cortes esse tecido conjuntivo apresentou-se descolado do cimento e migrado apicalmente e não foi possível observar células epiteliais nessas áreas (Figuras 10b e 11d).

As cristas ósseas alveolares e os septos inter-radiculares apresentavam-se reabsorvidos de forma irregular, sem o topo arredondado, mas sim inclinado, formando um defeito vertical. Nas superfícies da crista óssea notaram-se numerosas células gigantes

multinucleadas (osteoclastos) caracterizadas por vários núcleos arredondados e hipercromáticos inseridos em lacunas de reabsorção (Figura 11e). Os espaços medulares eram amplos e preenchidos no seu interior por tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e osteoblastos e, por vezes, osteoide revestia o tecido ósseo. Linhas reversas basofílicas eram mais marcadas e em maior número evidenciando maior processo de reabsorção. Em alguns cortes observaram-se osteoblastos volumosos e cúbicos revestindo a superfície óssea das cristas alveolares e inter-radiculares.

O ligamento periodontal, na sua parte mais coronária próximo ao defeito ósseo, apresentou inúmeras fibras colágenas dispostas de maneira aleatória e poucas células. Nas áreas mais apicais, o ligamento exibiu fibras de Sharpey inseridas no osso e cimento e bastante celularizado, no entanto com raríssimas células inflamatórias.

5.1.3 Grupos R1 a R6 (com ligadura e risendronato)

De maneira geral, os animais dos grupos tratados apresentaram características histológicas semelhantes das observadas nos grupos tratados com placebo. No entanto, os animais do grupo R1 foram os que mais mostraram diferenças em alguns aspectos. Os demais grupos mostraram semelhanças ao grupo placebo e em variado grau apresentaram particularidades encontradas no grupo R1. A descrição dos grupos R1 a R6 será feita a seguir, ressaltando principalmente as semelhanças e diferenças em relação ao grupo controle.

Os espécimes do grupo R1 foram os que mais mostraram diferenças comparadas com os grupos placebos. Raras áreas de reabsorção cementária ou dentinária foram vistas e em alguns dentes a polpa mostrou aspectos de normalidade (Figura 10c). Logo abaixo da

área de furca, o tecido conjuntivo mostrou-se aderido ao dente, exibindo fibras colágenas orientadas por vezes de maneira aleatória, e por vezes inseridas no tecido ósseo, além de vasos sanguíneos e ocasionais células inflamatórias (Figuras 10c e 12a). O osso inter-radicular exibiu sinais de reabsorção óssea, porém o tipo de defeito ósseo mais observado foi o horizontal. Da mesma forma, inúmeros osteoclastos foram notados, entretanto, alguns, principalmente não aderidos ao tecido ósseo, exibiam morfologia peculiar, que incluíam núcleos achatados e algumas vezes picnóticos e perda de integridade do material citoplasmático, sinais indicativos de apoptose celular (Figuras 12d e 12e). No ligamento periodontal, foram notadas áreas contendo inúmeros fibroblastos entremeados a fibras colágenas preservadas. Foram vistos áreas de trabéculas ósseas imaturas, contendo amplas lacunas com osteócitos volumosos e revestidos por osteoblastos cuboídes dispostos lado a lado (Figuras 12b e 12c). Em muitos casos foi possível perceber formação osteoide adjacente aos osteoblastos.

No grupo R2 foram notadas poucas áreas de reabsorção dentinária ou cementária e a polpa exibiu sinais de inflamação, com vasos congestionados e células inflamatórias. Alguns cortes exibiram padrão de defeito ósseo, ora vertical ora horizontal (Figura 10d). Da mesma forma, o tecido conjuntivo interposto entre a furca e a crista óssea exibiu áreas edemaciadas, com áreas de inflamação e fibras colágenas orientadas em diversas direções. O deslocamento apical do tecido conjuntivo foi notado em poucos cortes. Osteoclastos foram notados e exibiam morfologia arredondada contendo inúmeros núcleos hipercromáticos dentro de lacunas de reabsorção. Alguns osteoclastos com aspecto sugestivo de apoptose também foram notados próximos a superfície óssea. O ligamento periodontal exibiu intensa celularidade, principalmente de fibroblastos dispostos paralelamente a fibras colágenas, na maioria preservadas. Trabéculas imaturas contendo osteócitos volumosos e

revestida por osteoblastos cuboides foram vistos em grande parte dos cortes.

Os espécimes do grupo R3 exibiram características similares às vistas nos grupos placebo. Grandes áreas de reabsorção dentinária e cementária foram notadas, principalmente nas porções mais coronárias do dente, juntamente com colônias bacterianas aderidas e não aderidas aos tecidos dentais. Os defeitos ósseos foram, na sua maioria, verticais, com migração apical do tecido conjuntivo interposto (Figura 10e). Esse tecido apresentou-se edemaciado, com fibras colágenas fragmentadas e orientadas aleatoriamente, com raras células inflamatórias. Fragmentos de osso necrosado circundados por células bacterianas foram encontrados em alguns espécimes. O tecido ósseo mostrou amplos espaços medulares e poucas áreas de neoformação óssea, com moderado número de osteoblastos. Observaram-se inúmeros osteoclastos dentro de lacunas de reabsorção. Raros osteoclastos com morfologia irregular, compatível com apoptose foram notados.

No grupo R4, as áreas de reabsorção dentinária e cementária foram vistas em poucas e pequenas áreas e a polpa exibiu sinais de inflamação, com vasos congestos e células inflamatórias, na maioria mononucleadas. O defeito ósseo exibido pela maioria dos cortes foi horizontal e o tecido conjuntivo interposto entre a furca e a crista óssea exibiu sinais de inflamação, por vezes edemaciado, com fibras colágenas ora dispostas aleatoriamente, ora inseridas na crista óssea, e células inflamatórias (Figura 10f). O deslocamento apical do tecido foi notado em poucos espécimes. Numerosos osteoclastos foram notados na superfície óssea, ora dentro de lacunas de reabsorção ora separados do osso. Alguns exibiram características indicativas de apoptose. Notou-se também trabéculas imaturas de osso neoformado contendo osteócitos volumosos, e circunscritas por osteoblastos cuboides (Figura 12e).

Nos espécimes obtidos dos animais do grupo R5 foram notados áreas de reabsorção dentinária e cementária em todos os cortes,

de tamanho variável. O tecido ósseo apresentou defeito ósseo ora vertical ora horizontal e espaços medulares que variaram de tamanho médio a amplo (Figura 10g). Apenas espécime de um animal exibiu pequena área de sequestro ósseo. O tecido conjuntivo interposto apresentou-se ora aderido ao dente e com sinais de inflamação, como edema, inúmeros vasos sanguíneos e células inflamatórias e ora deslocado apicalmente, sem exibir sinais de inflamação contendo apenas fibras colágenas sem direção definida e vasos sanguíneos. O ligamento periodontal exibiu áreas de intensa celularidade, principalmente em áreas próximas à crista óssea. Inúmeras lacunas de reabsorção na superfície óssea foram vistas, contendo osteoclastos e poucas destas células exibiam sinais indicativos de apoptose. As trabéculas ósseas neoformadas eram pequenas, comparativamente às observadas no grupo R1, com menor número de osteoblastos.

No grupo R6 foram notadas características histológicas semelhantes ao grupo R3, tais como, numerosas áreas de reabsorção radicular, presença de colônias bacterianas aderidas e não aderidas, tecido conjuntivo interposto no defeito ósseo migrado apicalmente (Figura 10h). Tal tecido exibiu áreas edemaciadas, contendo fibras colágenas orientadas em diversas direções e pouco celularizado. No entanto, em nenhum corte foi notada presença de sequestro ósseo. O defeito ósseo observado em todos os cortes foi do tipo vertical e a matriz óssea exibiu espaços medulares amplos. Diversas áreas de reabsorção óssea contendo osteoclastos foram vistas e em poucos cortes essas células apresentaram aspectos alterados. Algumas áreas de neoformação óssea foram notadas e quando presentes exibiam trabéculas imaturas, contendo osteócitos volumosos e circundados por osteoblastos ora cuboideis ora achatados.

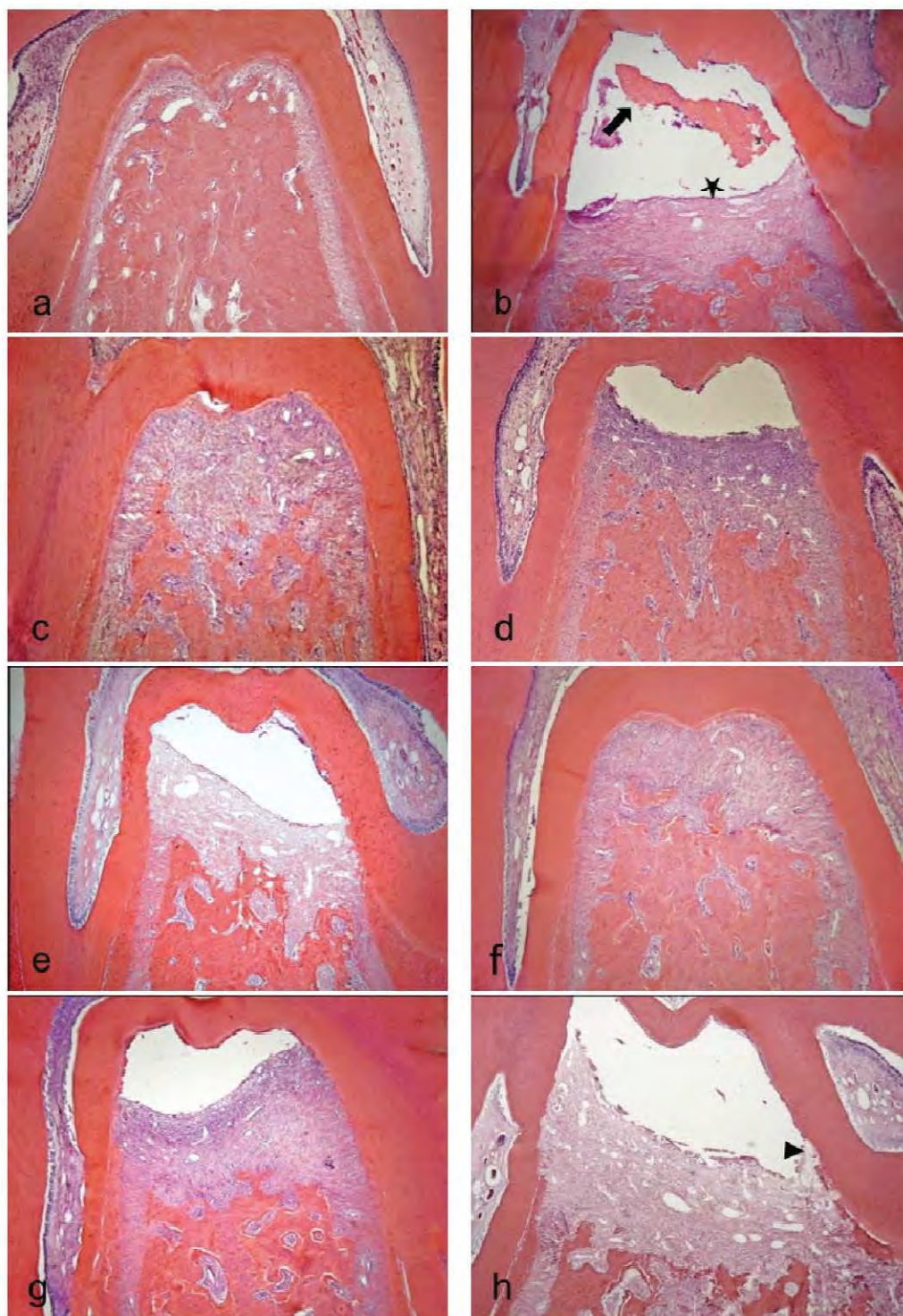


Figura 10 - a) Grupo C1: osso alveolar inter-radicular preservado e crista óssea com topo arredondado; b) Grupo A1: acentuada perda óssea exibindo fragmento de sequestro ósseo (↑) e migração apical do tecido conjuntivo (★); c) Grupo R1: perda óssea e reabsorção cementária discretas; d) Grupo R2: perda óssea moderada; e) Grupo R3: defeito ósseo vertical; f) Grupo R4: discreta perda óssea; g) Grupo R5: moderada perda óssea e defeito ósseo horizontal; h) Grupo R6, reabsorção óssea e cementária intensa (▶). HE, aumento original 100x.

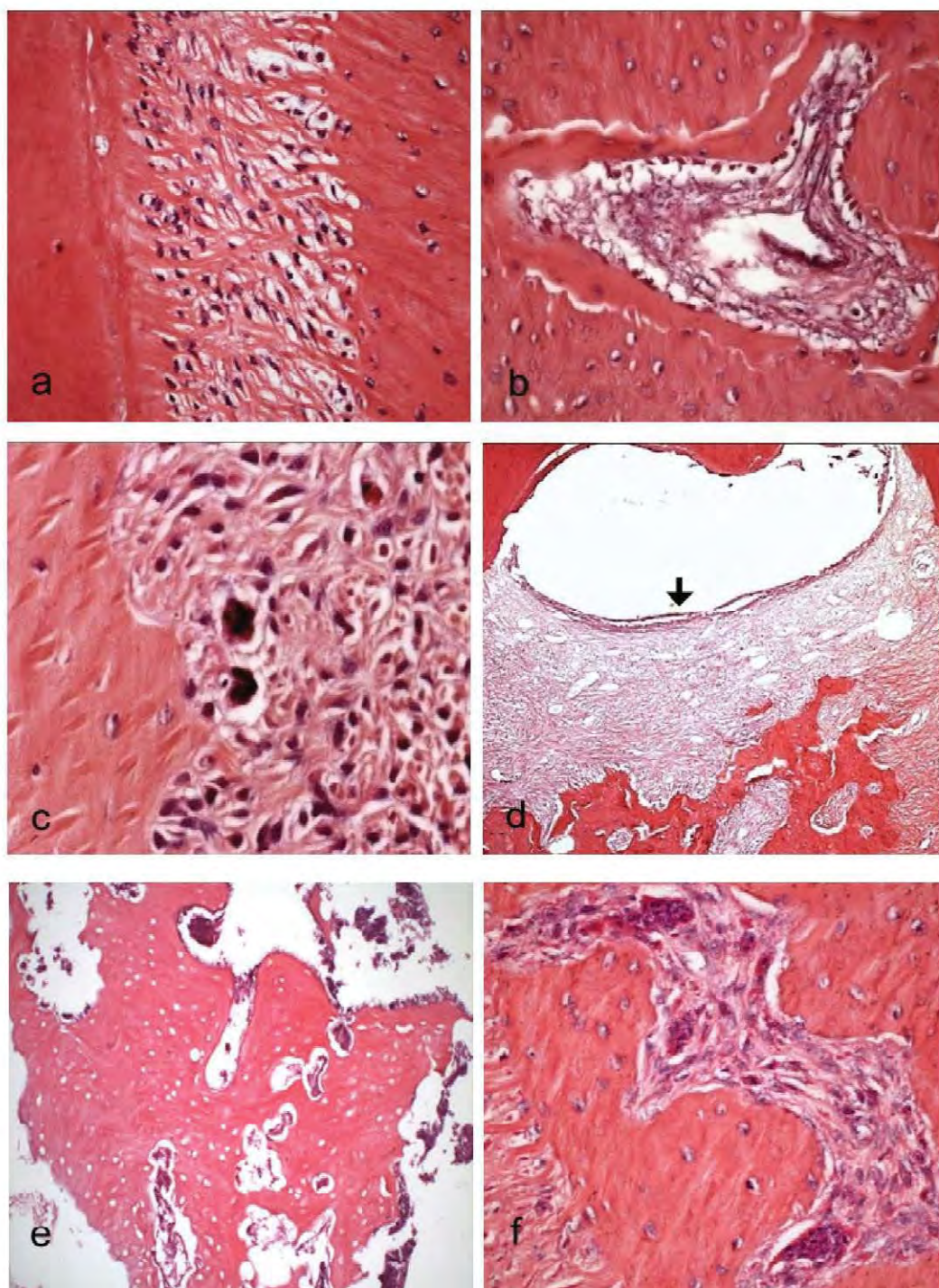


Figura 11 - a) Grupo C2: periodonto exibindo camada de cementoblastos sobre cimento acelular, fibroblastos fusiformes em meio a fibras de Sharpey inseridas no osso alveolar (He 400x); b) Grupo C1: tecido ósseo contornado por osteoblastos ora cuboides, ora achatados delimitando espaço medular (He 400x); c) Grupo C2: osteoclastos próximos à trabécula óssea com borda irregular (He 640x); d) Grupo A2: perda óssea inter-radicular e migração apical do tecido conjuntivo (↓) (He 100x); e) Grupo A1: fragmento de osso necrosado circundado por colônias bacterianas (He 200x); f) Grupo A2: espaço medular contendo osteoclastos volumosos com numerosos núcleos arredondados (He 400x).

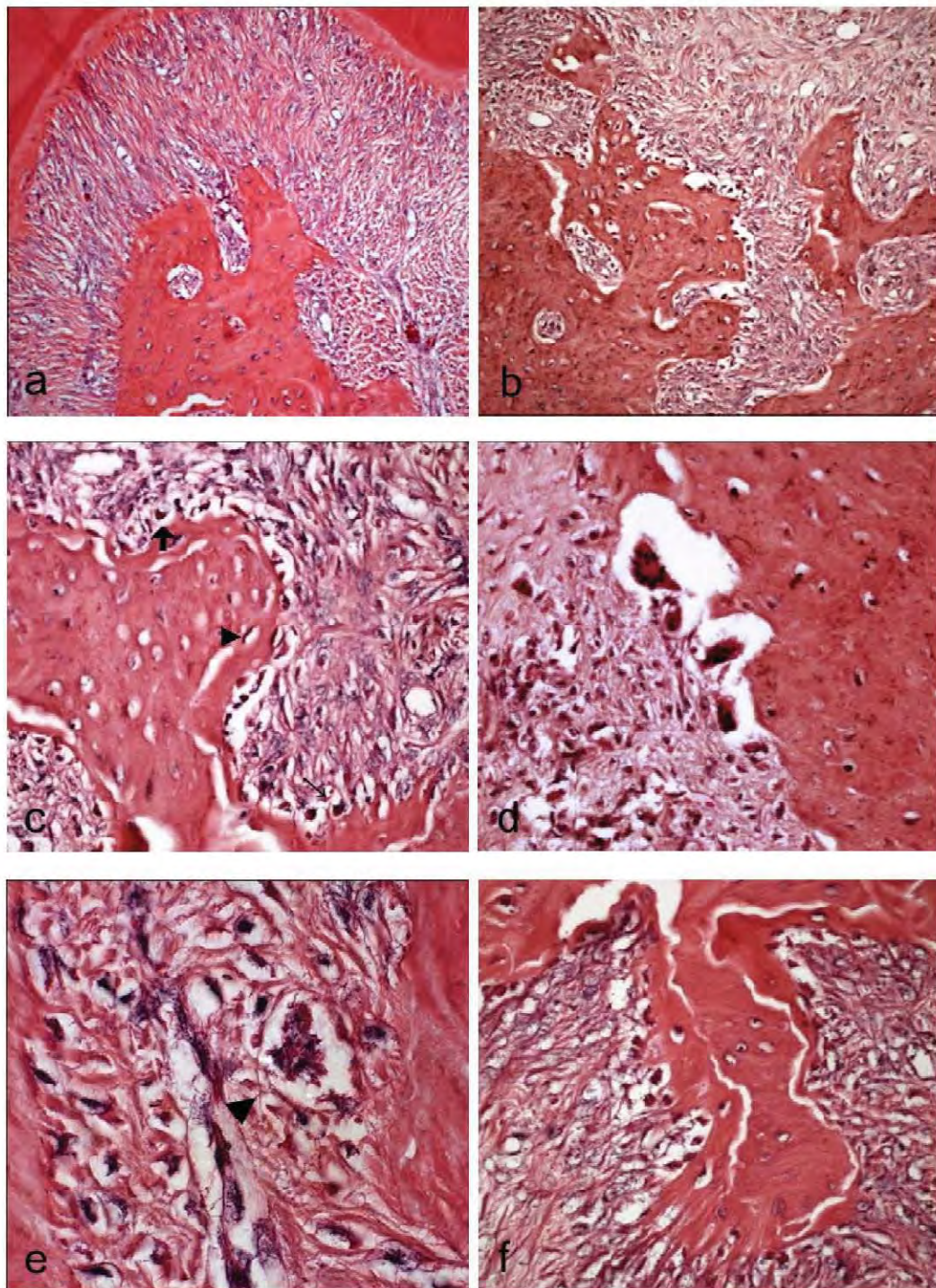


Figura 12 - a) Grupo R1: área da furca exibindo fibras de Sharpey por vezes inseridas ou orientadas aleatoriamente (HE, 200x); b) Grupo R1: trabéculas imaturas na crista óssea revestidas por osteoblastos (HE, 200x); c) Grupo R1: osteócitos volumosos (►) no interior de lacunas amplas e tecido ósseo neoformado revestido por osteoblastos cuboides (◄) (HE, 400x); d) Grupo R1: osteoclastos no interior de lacunas de reabsorção (HE, 400x); e) Grupo R1 osteoclasto com núcleos alterados e perda de integridade citoplasmática (►) (HE, 640x); f) Grupo R4: trabéculas neoformadas contendo osteócitos volumosos revestido por osteoblastos cuboides (HE, 400x).

5.2 Análise histomorfométrica

5.2.1 Volume trabecular da região da furca (VtF)

A estatística descritiva do VtF está apresentada de acordo com os grupos experimentais na Tabela 1.

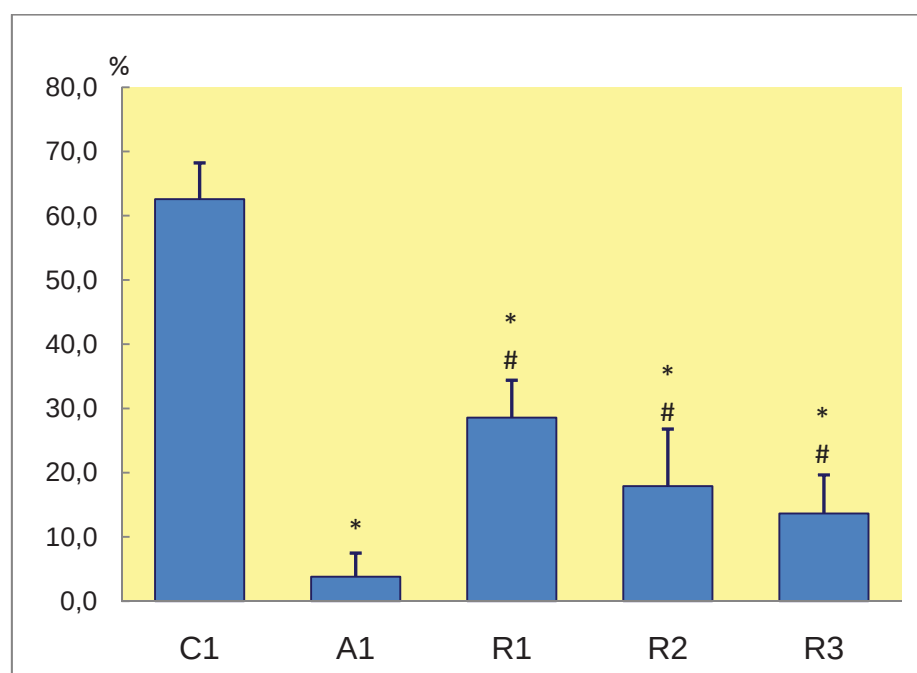
Tabela 1- Médias e desvio padrão do volume trabecular obtido na região de furca (VtF) dos grupos experimentais.

Grupos	N	Médias (%)	DP (%)
C1	6	62,58	± 4,53
C2	6	62,06	± 3,91
A1	6	3,80	± 2,95
A2	6	4,59	± 3,55
R1	6	28,56	± 4,66
R2	6	17,91	± 7,11
R3	6	10,91	± 4,82
R4	6	29,05	± 8,20
R5	6	19,48	± 10,62
R6	6	11,32	± 5,81

N: número; DP: desvio padrão

Por meio das figuras 13 e 14 notam-se os gráficos contendo as médias, desvios-padrão e a estatística inferencial dos animais pertencentes ao GD e GU respectivamente para o VtF.

Os dados originais, as tabelas do teste de Dunnet, ANOVA e de comparação múltipla de Tukey, referentes ao VtF estão exibidos no Apêndice A.

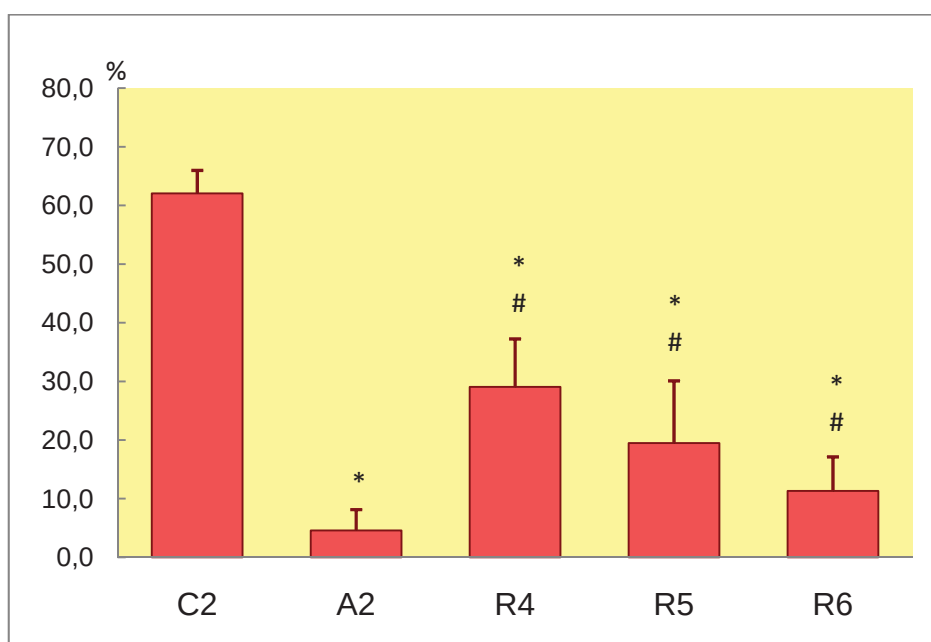


*: Difere estatisticamente do Grupo C1 (Teste comparativo de Dunnet, $p < 0,05$);

#: Difere estatisticamente do Grupo A1 (Teste comparativo de Dunnet, $p < 0,05$).

Figura 13 – Gráfico ilustrativo das médias e desvios-padrão referentes ao volume trabecular na região de furca (VtF) dos animais do GD.

Como pode-se observar na tabela 1, os grupos C1 e C2 (controle sem doença) foram os que apresentaram maiores valores nesse parâmetro, 62,58% e 62,06% respectivamente. No grupo GD (figura 13), comparando-se os demais subgrupos experimentais com o controle, pelo teste ANOVA, e *post hoc* Dunnet, verificamos significância estatística ($p < 0,05$). Da mesma forma, no grupo GU (figura 14), notou-se diferenças estatísticas na comparação dos subgrupos que receberam ligadura com o controle sem doença ($p < 0,05$).



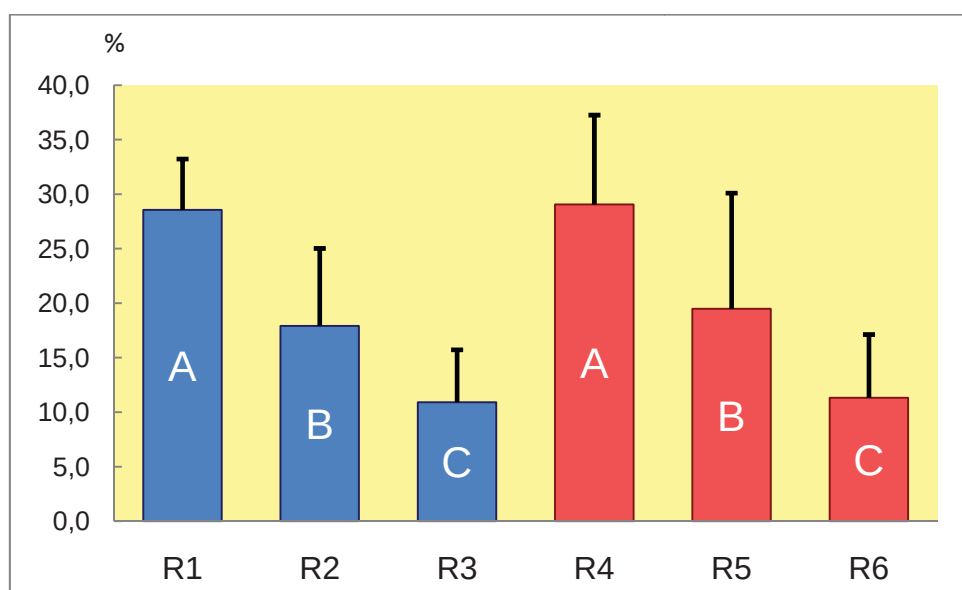
*: Difere estatisticamente do Grupo C2 (Teste comparativo de Dunnet, $p < 0,05$);

#: Difere estatisticamente do Grupo A2 (Teste comparativo de Dunnet, $p < 0,05$).

Figura 14 – Gráfico ilustrativo das médias e desvios-padrão referentes ao volume trabecular na região de furca dos animais do GU.

Comparando-se os animais que receberam tratamento com risendronato, com os animais que receberam placebo, independentemente da dose aplicada, observou-se que no GD quanto no GU, os valores nos grupos tratados foram maiores e diferiram estatisticamente quando comparados aos dos grupos placebo (ANOVA, *post hoc* Dunnet; $p < 0,05$). As maiores diferenças observadas foram na comparação R1 (28,56%) x A1 (3,80%) e R4 (29,05%) x A2 (4,59%).

A comparação estatística somente entre os grupos tratados (R1 a R6) está exibida na Figura 15. Através de análise pelo teste ANOVA observou-se que apenas as dosagens diferiam estatisticamente entre si ($p = 0,00001$). A comparação entre única e dupla aplicação não exibiu diferenças estatísticas (ANOVA, $p = 0,6786$). A interação dose/número de aplicações também não atingiu diferença estatística (ANOVA, $p = 0,9697$).



Letras iguais não diferem estatisticamente (ANOVA, post hoc Tukey).

Figura 15 – Gráfico ilustrativo das médias e desvios-padrão referentes ao volume trabecular na região de furca (VtF) dos grupos de animais que receberam risendronato.

A observação pela análise de Tukey evidencia que os grupos que receberam doses menores de risendronato (R1 e R4), foram superiores que os grupos que receberam dosagem intermediária (R2 e R5), que por sua vez, foram superiores a grupos nos quais se utilizou doses maiores (R3 e R6). No entanto, os grupos de mesma dosagem exibiram comportamento semelhante.

5.2.2 Volume trabecular da região da crista óssea inter-radicular (VtC)

O volume trabecular da crista inter-radicular remanescente (VtC) foi quantificado e os valores em porcentagem estão representados na tabela 2.

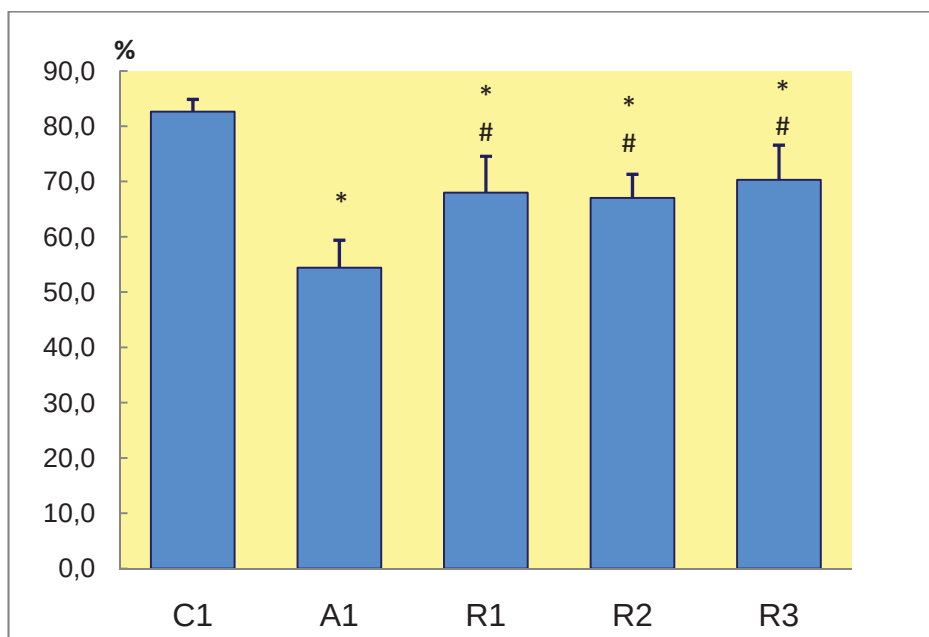
Tabela 2 - Médias e desvio padrão do volume trabecular obtido na região da crista inter-radicular (VtC) dos grupos experimentais.

Grupos	N	Médias (%)	DP (%)
C1	6	82,63	± 2,24
C2	6	82,17	± 2,70
A1	6	54,41	± 4,97
A2	6	55,15	± 5,34
R1	6	67,98	± 6,60
R2	6	67,03	± 4,28
R3	6	70,30	± 6,29
R4	6	70,06	± 3,42
R5	6	70,72	± 2,20
R6	6	69,52	± 3,25

N: número; DP: desvio-padrão.

Os gráficos contendo as médias, desvios-padrão e a estatística inferencial dos animais pertencentes ao GD e GU respectivamente para o VtC podem ser visualizados pelas figuras 16 e 17.

Os dados originais, as tabelas do teste de ANOVA, Dunnet e de comparação múltipla de Tukey referentes ao VtC estão exibidos no Apêndice B.

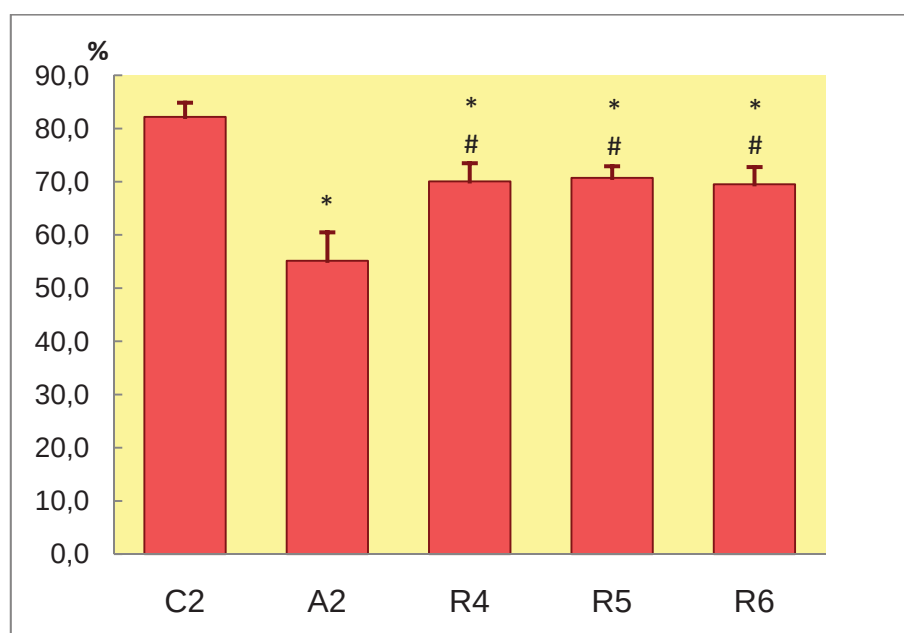


*: Difere estatisticamente do Grupo C1 (Teste comparativo de Dunnet, $p < 0,05$);
#: Difere estatisticamente do Grupo A1 (Teste comparativo de Dunnet, $p < 0,05$).

Figura 16 – Gráfico ilustrativo das médias e desvios-padrão referentes ao VtC dos animais do GD.

Os grupos C1 e C2 (controle sem doença) foram os que apresentaram maiores valores nesse parâmetro, 82,63% e 82,17% respectivamente. Tanto no GD, quanto no GU, a comparação dos grupos controles com os demais, pelo teste ANOVA e *post hoc* Dunnet, exibiu significância estatística ($p < 0,05$).

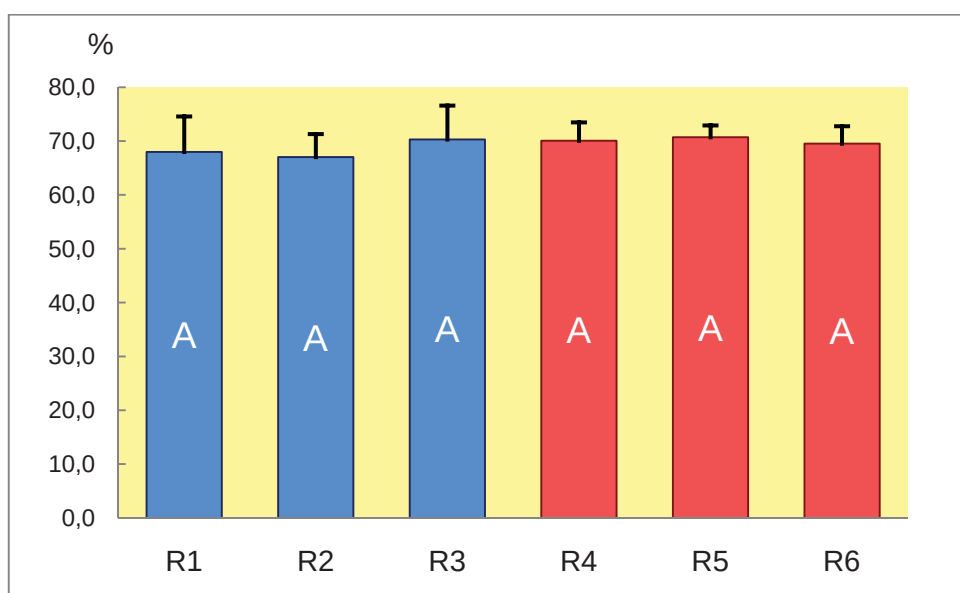
Comparando-se os animais que receberam tratamento com risendronato, com os animais que receberam placebo, independentemente da dose aplicada, observou-se que tanto no GD quanto no GU, os valores nos grupos tratados foram maiores e diferiam estatisticamente quando comparados aos dos grupos placebos (ANOVA, *post hoc* Dunnet; GD, $p < 0,05$). As maiores diferenças foram observadas na comparação R3 (70,30%) x A1 (54,41%) e R5 (70,72%) x A2 (55,15%).



*: Difere estatisticamente do Grupo C2 (Teste comparativo de Dunnet, $p < 0,05$);
 #: Difere estatisticamente do Grupo A2 (Teste comparativo de Dunnet, $p < 0,05$).

Figura 17 – Gráfico ilustrativo das médias e desvios-padrão referentes ao VtC dos animais do GU.

Os valores médios e desvios-padrão do VtC apenas dos grupos experimentais (R1 a R6) bem como a estatística inferencial são exibidos pela figura 18. A análise estatística pelo teste ANOVA mostrou que não houve diferença estatística significativa entre os grupos em relação às dosagens ($p=0,8562$), a quantidade de aplicações ($p=0,4013$) e na interação dessas variáveis ($p=0,5296$). Dessa forma, as três diferentes dosagens e a quantidade de aplicações não mostraram comportamento diferente nesse parâmetro.



Letras iguais não diferem estatisticamente (Comparação múltipla de Tukey).

Figura 18 – Gráfico ilustrativo das médias e desvios-padrão referentes ao VtC dos grupos de animais que receberam risendronato.

5.2.3 Medida de distância linear entre a furca e a crista óssea inter-radicular (DL)

A tabela 3 abaixo mostra os valores médios e desvios-padrão da distância do teto da furca ao topo do septo ósseo medida em micrômetros.

Por meio das figuras 19 e 20 podem-se observar os gráficos contendo as médias, desvios-padrão e a estatística inferencial pelo teste ANOVA e *post hoc* Dunnet dos animais pertencentes ao GD e GU respectivamente para o parâmetro DL.

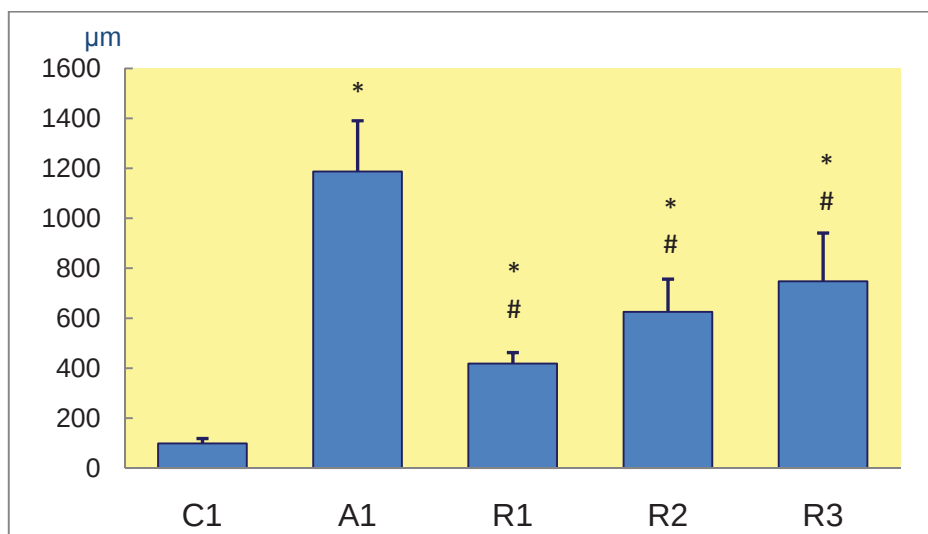
Tabela 3 - Valores médios e desvios-padrão da distância entre a furca e o septo inter-radicular (DL) dos grupos experimentais.

Grupos	N	Médias (µm)	DP (µm)
C1	6	98,64	16,69
C2	6	98,51	12,99
A1	6	1188,04	180,16
A2	6	1177,85	344,01
R1	6	419,59	37,68
R2	6	624,85	128,73
R3	6	747,60	179,75
R4	6	427,62	148,18
R5	6	606,28	110,99
R6	6	827,31	204,53

N: número; DP: desvio-padrão

Os dados originais, as tabelas do teste de ANOVA, Dunnet e de comparação múltipla de Tukey referentes ao parâmetro DL estão exibidos no Apêndice C.

Os menores valores foram observados nos animais dos grupos C1 (98,64 µm) e C2 (98,51 µm) e refletem basicamente o espaço preenchido pelo ligamento periodontal na região da furca. Pelo teste ANOVA e *post hoc* Dunnet, observamos que os grupos que receberam ligadura exibiram maiores médias que foram estatisticamente significantes em comparação com o controle sem doença ($p < 0,05$). Da mesma forma que os anteriores analisados, esse parâmetro evidenciou que a inserção de ligaduras foi eficaz em produzir perda óssea no periodonto desses animais.



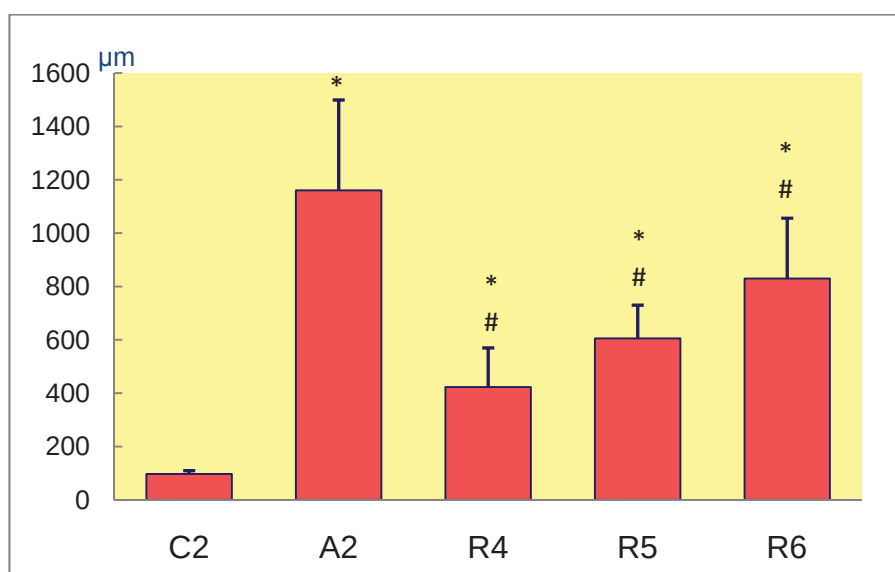
*: Difere estatisticamente do Grupo C1 (Teste comparativo de Dunnet, $p < 0,05$);

#: Difere estatisticamente do Grupo A1 (Teste comparativo de Dunnet, $p < 0,05$).

Figura 19 – Gráfico ilustrativo das médias e desvios-padrão referentes DL dos animais do GD.

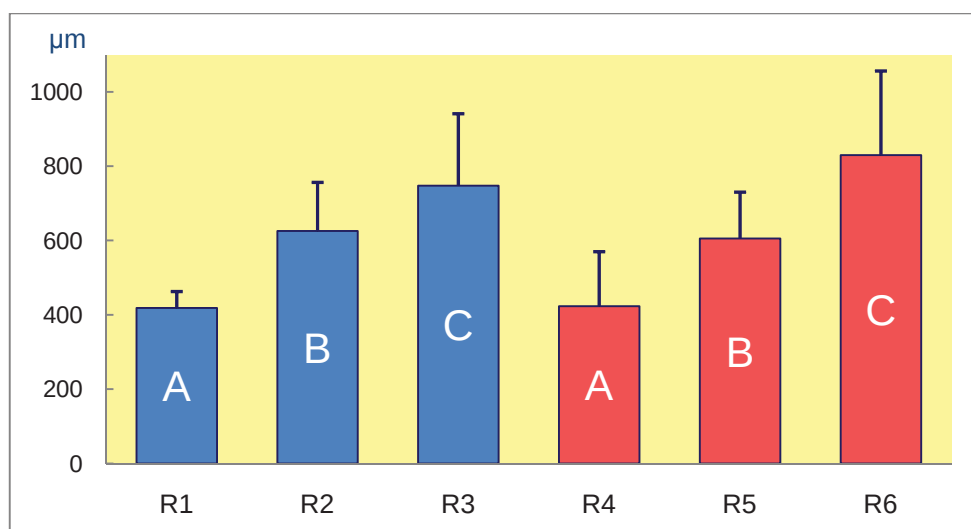
Comparando-se os animais que receberam tratamento com risendronato, com os animais que receberam placebo, independentemente da dose aplicada, observou-se que tanto no GD quanto no GU, os valores nos grupos tratados foram menores e diferiam estatisticamente quando comparados aos dos grupos placebos (ANOVA, *post hoc* Dunnet; $p < 0,05$). As maiores diferenças foram observadas na comparação A1 (1188,04 µm) x R1 (419,59 µm) no GD e A2 (1177,85 µm) x R4 (427,62 µm) no GU. Esses resultados evidenciam que o tratamento com risendronato foi mais eficaz em prevenir a perda óssea alveolar que o tratamento com placebo.

Na figura 21 observam-se os valores médios e desvios-padrão, além da estatística inferencial através do teste de ANOVA e comparação múltipla de Tukey da DL apenas dos grupos experimentais que receberam risendronato (R1 a R6).



*: Difere estatisticamente do Grupo C2 (Teste comparativo de Dunnet, $p < 0,05$);
#: Difere estatisticamente do Grupo A2 (Teste comparativo de Dunnet, $p < 0,05$).

Figura 20 – Gráfico ilustrativo das médias e desvios-padrão referentes DL dos animais do GU.



Letras iguais não diferem estatisticamente (ANOVA e comparação múltipla de Tukey).

Figura 21 – Gráfico ilustrativo das médias e desvios-padrão referentes DL dos grupos de animais que receberam risendronato.

A análise dos dados pelo teste ANOVA, indica que apenas as dosagens mostraram diferenças estatísticas ($p=0,00001$). A quantidade de aplicações e a relação dose/aplicações não foram significantes ($p=0,6369$ e $p=0,6954$, respectivamente). Por meio da figura 19, nota-se que houve menor perda óssea nos animais que receberam as doses menores (R1 e R4), seguido dos que receberam doses intermediárias (R2 e R5) e os que apresentaram piores resultados foram os dois grupos na qual se utilizou as maiores doses (R3 e R6). Pela comparação múltipla de Tukey (5%), verificou-se que os grupos de mesma dosagem foram homogêneos entre si e diferiram dos demais, que utilizaram doses diferentes.

5.3 Análise imuno-histoquímica

A análise imuno-histoquímica da expressão da osteocalcina foi feita por examinador cego e calibrado. O valor de Kappa obtido no procedimento de calibração foi de 0,76. De acordo com Landis e Koch (1977), valores de Kappa entre 0,6 – 0,8 são considerados concordância satisfatória. Kleiss, 1981, classifica valores de Kappa acima de 0,75 como excelente nível de concordância.

Para todos os grupos analisados, classificou-se a intensidade da imunomarcagem da osteocalcina das estruturas e células pré-definidas como sendo ausente (-), discreta (+), moderada (++) ou intensa (+++). Essa abordagem foi aplicada em outros trabalhos (Lekic et al., 1996; Ivanovski et al., 2000; Ivanovski et al., 2001; Silvestrini et al., 2005; Adeyemo et al., 2008; Kim et al., 2009; Tera, 2010)

Foram analisadas na região inter-radicular as seguintes estruturas: tecido conjuntivo pulpar, odontoblastos, matriz cementária, cementoblastos, cementócitos, fibras colágenas do ligamento periodontal,

fibroblastos, endotélio, tecido conjuntivo medular, matriz óssea madura, matriz osteoide, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.

As estruturas marcadas e a intensidade da marcação encontram-se listadas na tabela 4.

Tabela 4 - Estruturas marcadas e intensidade de marcação para a osteocalcina.

	C1/C2	A1/A2	R1	R2
<i>(continua)</i>				
<u>Dente</u>				
Tecido pulpar	++ a +++	++ a +++	+++	++
Odontoblastos	++	++	++	++
<u>Cemento</u>				
Matriz cementária	- a +	-	+ a ++	+
Cementócitos	-	-	-	-
Cementoblastos	+	+	++	+ a ++
<u>Ligamento periodontal</u>				
Osteoblastos LP	+	+	++ a +++	+ a ++
TC periodontal	+	+ a ++	++	+
Fibroblastos	++	+ a ++	++ a +++	++
Endotélio	+	+	+ a ++	+ a ++
<u>Tecido ósseo</u>				
Matriz óssea madura	+	+	+	+
Osteoclastos	+	+	+	+
Osteoblastos	+ a ++	+	++ a +++	++
Osteócitos	-	-	- a +	-
Matriz osteoide	+ a ++	+	++	+

Tabela 4 - Estruturas marcadas e intensidade de marcação para a osteocalcina.

	(conclusão)			
	R3	R4	R5	R6
<u>Dente</u>				
Tecido pulpar	++ a +++	+++	++ a +++	+++
Odontoblastos	++	++	++	++
<u>Cimento</u>				
Matriz cementária	- a +	+	- a +	+
Cementócitos	-	-	-	-
Cementoblastos	+	+ a ++	+	+
<u>Ligamento periodontal</u>				
Osteoblastos LP	+	+ a ++	+	+
TC periodontal	+	+ a ++	+ a ++	++
Fibroblastos	++	++	+ a ++	++
Endotélio	+	+ a ++	+	+
<u>Tecido ósseo</u>				
Matriz óssea madura	+	+	+	+
Osteoclastos	+	- a +	- a +	+
Osteoblastos	+ a ++	++	+ a ++	+ a ++
Osteócitos	-	- a +	-	-
Matriz osteoide	+	+	+	+

TC: tecido conjuntivo; LP: ligamento periodontal

A descrição detalhada de cada grupo será feita a seguir. Apenas quatro estruturas não apresentaram variações da imunomarcação da OCC em relação às diferentes terapias que se adotaram nesse trabalho. As estruturas foram: o tecido conjuntivo pulpar e os odontoblastos que apresentaram marcação variando de moderada a intensa, a matriz óssea madura cuja intensidade foi sempre discreta e os cementócitos, que não apresentaram marcação. Os grupos C1 e C2 serão descritos conjuntamente, assim como os grupos A1 e A2, por apresentaram exatamente as mesmas características imuno-histoquímicas.

5.3.1 Grupos C1 e C2

No ligamento periodontal, observou-se marcação discreta de fibroblastos e células endoteliais. O tecido conjuntivo exibiu positividade moderada. Os osteoblastos do ligamento periodontal revestiam a superfície óssea do ligamento e apresentaram marcação ora moderada ora discreta (Figura 22a). A matriz cementária mostrou algumas áreas com positividade discreta e em outras foi ausente. Os cementoblastos sobre a matriz na maioria dos cortes exibiu discreta marcação, em poucos se mostrou moderada.

O tecido ósseo inter-radicular mostrou-se denso e com poucos espaços medulares. Os osteócitos não foram marcados e os osteoclastos presentes em lacunas de reabsorção apresentaram marcação discreta e alguns poucos se marcaram moderadamente (Figura 22a). Os osteoblastos presentes tanto na superfície da crista óssea como dentro de espaços medulares mostrou marcação citoplasmática variando de discreta a moderada. A matriz osteoide ao redor de poucos osteoblastos, principalmente dentro dos espaços medulares e próxima ao ligamento periodontal mostrou semelhante positividade.

5.3.2 Grupos A1 e A2

O tecido conjuntivo do ligamento periodontal, composto principalmente por colágeno, exibiu marcação variando de moderada a intensa. Da mesma forma, os fibroblastos do ligamento mostraram marcação citoplasmática. Os osteoblastos da margem óssea do ligamento periodontal e as células endoteliais exibiram marcação discreta.

O tecido conjuntivo entre a furca e a crista óssea remanescente, formado basicamente por tecido de granulação, composto de fibras colágenas e vasos sanguíneos neoformados e fibroblastos jovens mostrou positividade semelhante às estruturas similares observadas no ligamento periodontal. Quando presentes, os fragmentos de osso necróticos exibiram marcação discreta da matriz.

O tecido ósseo apresentou-se reduzido, decorrente da lesão periodontal. Os osteócitos presentes na matriz não mostraram marcação positiva e os osteoclastos em lacunas de reabsorção exibiram marcação discreta na maioria dos casos (Figura 22b). Os osteoblastos mostraram marcação discreta e em algumas áreas negativa (Figura 22b). As áreas de osteoide eram escassas, porém quando presentes mostraram-se com positividade discreta.

5.3.3 Grupo R1

A expressão da OCC no ligamento periodontal nesses animais mostrou-se de moderada a intensa nos fibroblastos e moderada no restante do tecido conjuntivo. Os osteoblastos que recobriam a superfície óssea alveolar exibiram marcação ora moderada ora intensa.

As áreas mais externas da matriz cementária, próxima a inserção das fibras de Sharpey exibiram marcação positiva de discreta a moderada e os cementoblastos que recobriam o cimento estavam moderadamente marcados (Figura 22c).

O tecido conjuntivo entre a furca e a crista óssea expressou marcação ora moderada, ora intensa, da mesma forma que os endoteliócitos e fibroblastos nele presentes (Figura 22d).

A matriz óssea madura exibiu áreas de marcação discreta e osteócitos negativos. Em regiões de trabéculas ósseas imaturas,

osteócitos volumosos exibiam marcação discreta (Figura 22f). Osteoblastos apresentaram marcação ora intensa ora moderada, tanto na superfície da crista óssea, quanto no interior dos espaços medulares (Figura 22e). Permeando osteoblastos, as áreas de matriz osteoide exibiram marcação citoplasmática discreta (Figura 22f). Alguns poucos osteoclastos apresentaram positividade citoplasmática discreta.

5.3.4 Grupo R2

O tecido conjuntivo do ligamento periodontal mostrou-se discretamente marcado e os fibroblastos permeando as fibras colágenas exibiram positividade moderada. Os osteoblastos ao redor do ligamento e as células endoteliais apresentaram marcação ora discreta ora moderada.

Os cementoblastos mostraram marcação ora discreta ora moderada e a matriz adjacente apresentaram áreas de positividade discreta. A matriz cementária madura não mostrou marcação.

O tecido conjuntivo interposto entre a furca a crista óssea exibiu marcação ora moderada ora discreta e os fibroblastos e endoteliócitos mostrara-se moderadamente marcado na maioria dos cortes.

Os osteócitos da matriz óssea madura não mostraram marcação, apenas alguns raros exibiram marcação discreta em áreas de trabéculas ósseas neoformadas. Os osteoblastos, dispostos em camada sobre a superfície óssea tiveram marcação moderada. Adjacentes aos osteoblastos, as áreas de matriz osteoide apresentaram marcação discreta. Da mesma forma, osteoclastos exibiram marcação discreta.

5.3.5 Grupo R3

A imunomarcaco da OCC nos animais do grupo R3 pouco diferiu da observada nos animais do grupo R2. O tecido conjuntivo periodontal, osteoblastos do ligamento e endoteliócitos mostraram marcação discreta. Os fibroblastos, no entanto, exibiram positividade moderada.

A matriz cementária madura não apresentou marcação positiva, e os cementoblastos mostraram marcação citoplasmática discreta. Poucas áreas de matriz cementária imatura próximas a cementoblastos positivas foram notadas e de forma discreta.

O tecido conjuntivo interposto entre a furca e a crista mostrou marcação semelhante ao tecido conjuntivo do ligamento periodontal, da mesma forma, os fibroblastos e vasos sangneos. Alguns cortes exibiam áreas de sequestro ósseo, cuja marcação da matriz foi discreta.

Osteoblastos da superfície óssea e no interior dos espaços medulares apresentaram marcação citoplasmática variando de discreta a moderada e as áreas de matriz osteoide adjacentes mostraram-se discretamente positivas. Osteócitos da matriz madura e de áreas de trabéculas imaturas foram negativos. Osteoclastos apresentaram positividade discreta.

5.3.6 Grupo R4

O tecido conjuntivo do ligamento periodontal mostrou marcação ora discreta ora moderada, da mesma forma os endoteliócitos e

os osteoclastos adjacentes ao ligamento. Os fibroblastos exibiram marcação moderada.

A matriz cementária madura não apresentou marcação, mas em certas áreas superficiais do cimento, notou-se marcação discreta. Cementoblastos revestindo áreas do cimento acelular e celular exibiram marcação variando de discreta a intensa.

Abaixo da região da furca, o tecido conjuntivo frouxo interposto exibiu marcação moderada. As células endoteliais e os fibroblastos inseridos nesse tecido exibiram positividade ora discreta ora moderada.

Na crista óssea, a maioria dos osteoblastos da superfície mostrou marcação moderada, e poucos exibiram marcação intensa. Os osteoblastos localizados nos espaços medulares exibiram positividade semelhante. Osteócitos localizados na matriz mineralizada madura foram negativos, já outros, volumosos, localizados em trabéculas imaturas exibiram positividade discreta. Áreas de matriz osteoide mostraram marcação por vezes discreta, por vezes ausente.

5.3.7 Grupo R5

Os fibroblastos do ligamento e o tecido conjuntivo periodontal exibiram marcação semelhante, ora discreta ora moderada. Já os osteoblastos e as células endoteliais exibiram predomínio de marcação discreta.

A matriz cementária madura não exibiu positividade, apenas poucas áreas superficiais foram positivas de forma discreta. Os cementoblastos também exibiram marcação citoplasmática discreta.

O tecido conjuntivo interposto entre a furca e a crista óssea exibiu positividade variando de discreta a moderada. Fibroblastos e endoteliócitos exibiram o mesmo padrão de marcação.

A matriz óssea madura exibiu marcação discreta, osteoblastos da superfície óssea e no interior de espaços medulares exibiram marcação ora moderada ora discreta. A matriz osteoide apresentou marcação discreta. Osteoclastos apresentavam-se ora marcados discretamente, ora negativos. Osteócitos da matriz óssea madura ou próximos a trabéculas ósseas imaturas não exibiram positividade.

5.3.8 Grupo R6

A imunomarcação do grupo R6 se assemelhou da observada nos animais do grupo R5. Os osteoblastos do ligamento e endoteliócitos mostraram marcação discreta. Os fibroblastos e o tecido conjuntivo de fundo, no entanto, exibiram positividade variando de discreta a moderada.

A matriz cementária madura não apresentou marcação positiva, e os cementoblastos mostraram marcação citoplasmática discreta. Poucas áreas de matriz cementária imatura próximas a cementoblastos mostrou positividade discreta.

O tecido conjuntivo interposto entre a furca e a crista mostrou marcação semelhante ao tecido conjuntivo do ligamento periodontal, da mesma forma, os fibroblastos e vasos sanguíneos. Alguns cortes exibiam áreas de sequestro ósseo, cuja marcação foi discreta.

Osteoblastos da superfície óssea e no interior dos espaços medulares apresentaram marcação citoplasmática variando de discreta a moderada, e raramente intensa. As áreas de matriz osteoide

adjacentes mostraram-se discretamente positivas. Osteócitos da matriz madura e de áreas de trabéculas imaturas foram negativos. Osteoclastos apresentaram positividade discreta.

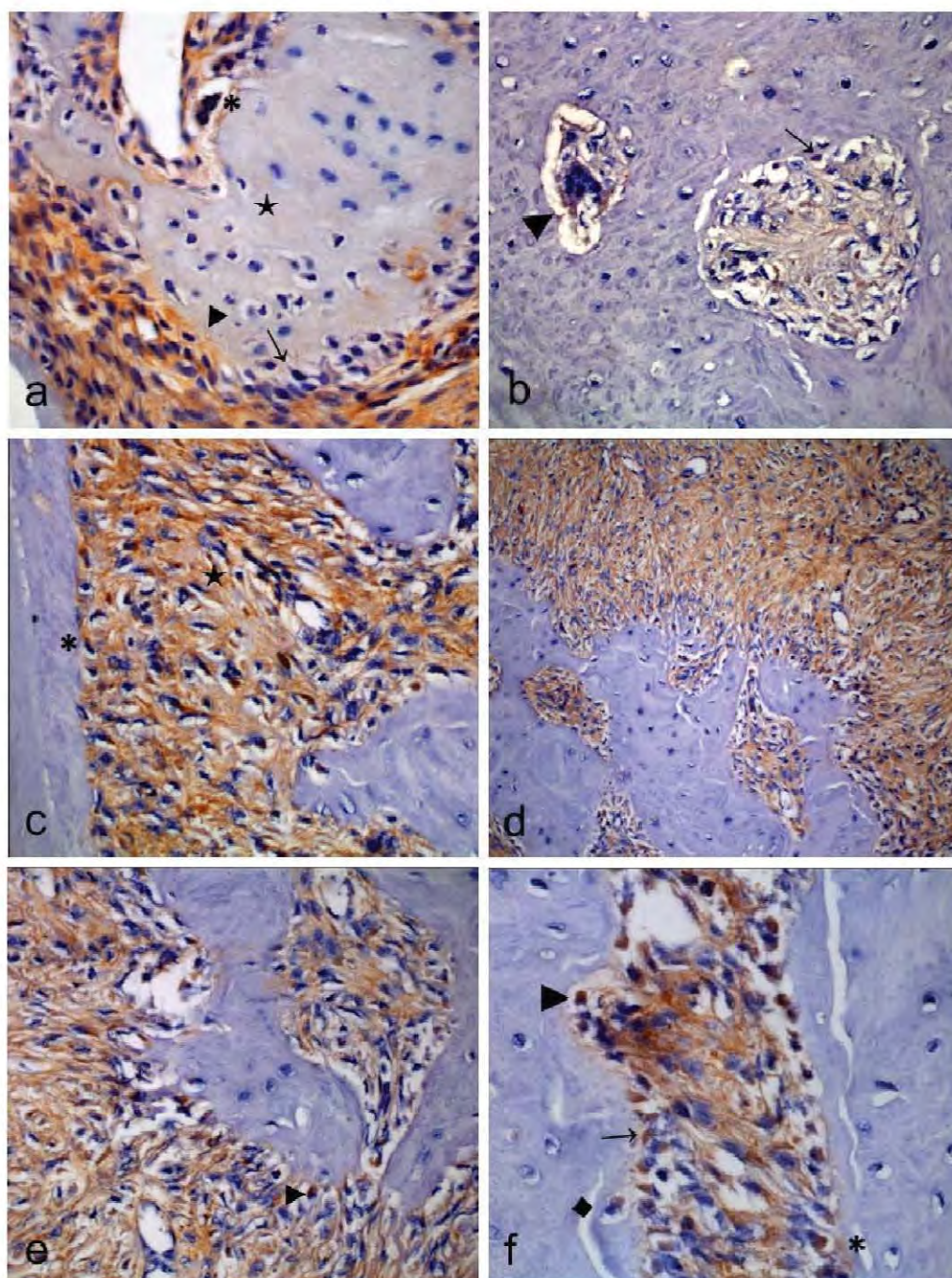


Figura 22 - a) Grupo C1: tecido ósseo com marcação discreta (*), circundado por osteoblastos com imunoexpressão variada (↑, ▼), e osteoclasto marcado discretamente (*); b) Grupo A2: camada de osteoblastos com ausência de marcação (↑) e marcação moderada de osteoclasto (▴); c) Grupo R1: ligamento periodontal exibindo fibroblastos e fibras colágenas intensamente marcadas (*) e cementoblastos com marcação moderada (*); d) Grupo R1: tecido conjuntivo interposto entre furca e a crista óssea com positividade de moderada a intensa; e) trabécula neoformada, circundada por osteoblastos com marcação intensa (▴); f) Grupo R1: osteoide com marcação discreta (*) revestido por osteoblastos marcados ora moderada (↑), ora intensamente (▴) e osteócito com marcação discreta (◆). Aumentos originais: a, b, c, e (400x); d (200x); f (640x).

5.4 Análise enzimo-histoquímica

A calibração prévia intra-examinador desse estudo foi feita baseada no cálculo do coeficiente de variação (CV%) previamente descrito. O valor de CV obtido foi de 4,47%, demonstrando que o examinador exibiu grau aceitável de calibração (Perini et al., 2005).

Consideraram-se positivas as células mono e multinucleadas que exibiram coloração citoplasmática magenta. Ambas as células, quando positivas receberam escore 1 (Figura 23). Para cada animal se obteve 3 campos sobre a crista óssea, sem entretanto haver sobreposição. Após contagem de cada campo, se obteve o valor de cada animal. O valor de cada grupo foi obtido pela soma dos valores de cada animal e calculando-se a média (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores médios e desvios-padrão do número de células TRAP-positivas para todos os grupos experimentais.

Grupos	N	Médias	DP
C1	6	10,50	4,59
C2	6	9,67	3,39
A1	6	24,17	6,82
A2	6	25,67	11,78
R1	6	15,17	6,52
R2	6	20,67	10,76
R3	6	22,33	6,09
R4	6	23,67	15,86
R5	6	28,33	12,21
R6	6	23,33	5,32

N: número; DP: desvio-padrão

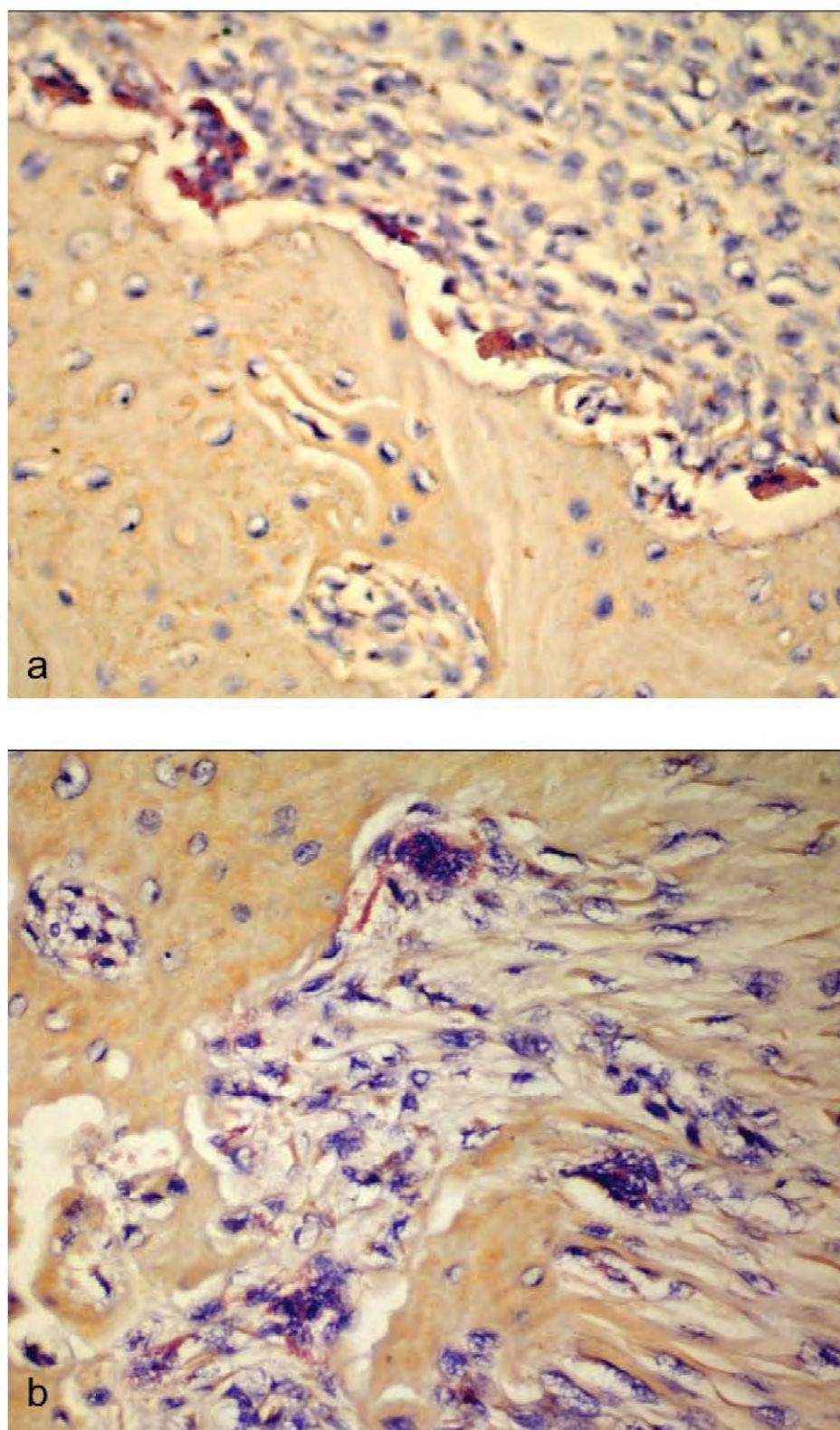
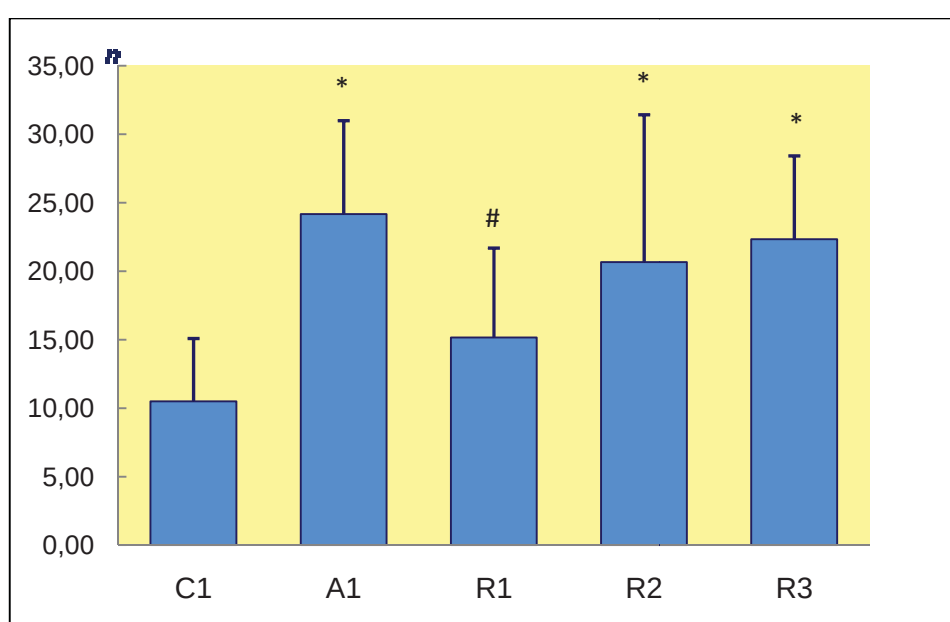


Figura 23 – a) Grupo R2 – Marcação positiva de células mono e multinucleadas sobre superfície de crista óssea (Aumento original 400x); b) Grupo R4 – Marcação positiva de células mono e multinucleadas próximas ao ligamento periodontal (Aumento original 400x).

Os gráficos referentes aos valores médios e a estatística inferencial dos grupos GD e GU, pelo teste ANOVA e *post hoc* Dunnet, em relação às células positivas para o TRAP podem ser notados nas figuras 24 e 25 respectivamente.

Os dados originais, as tabelas do teste de ANOVA, Dunnet e de comparação múltipla de Tukey referentes ao TRAP estão exibidos no Apêndice D.

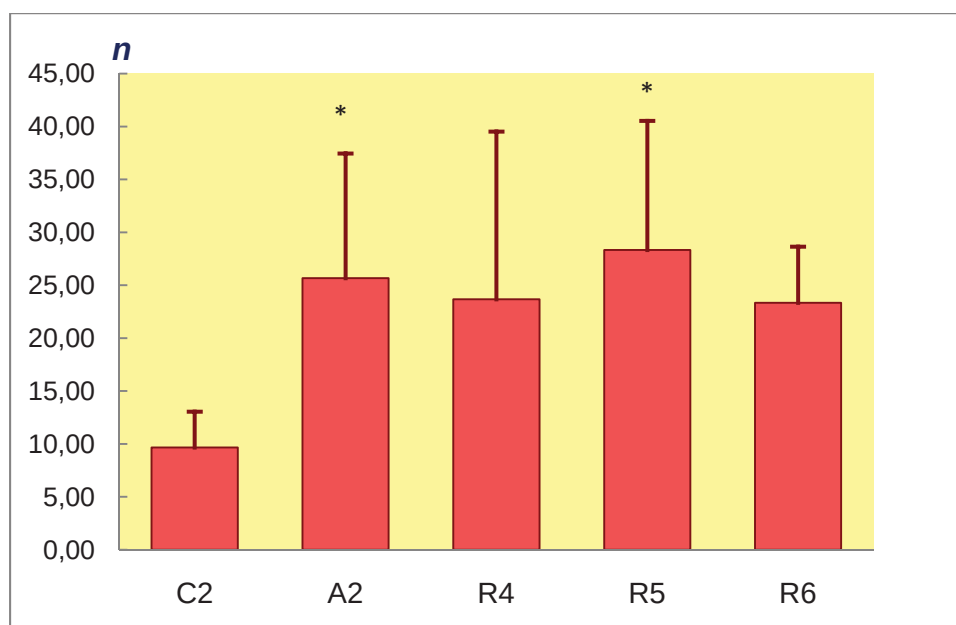


*: Difere estatisticamente do Grupo C1 (Teste comparativo de Dunnet, $p < 0,05$);
#: Difere estatisticamente do Grupo A1 (Teste comparativo de Dunnet, $p < 0,05$);
n: número de células TRAP-positivas.

Figura 24 – Gráfico ilustrativo das médias e desvios-padrão referentes ao número de células TRAP-positivas do GD.

Em relação ao GD, a comparação dos grupos experimentais que receberam ligadura com o controle sem doença exibiu significância estatística com os grupos A1, R2 e R3 (ANOVA, *post hoc* Dunnet, $p < 0,05$). Não foi notada significância apenas na comparação C1 x R1 (ANOVA, *post hoc* Dunnet, $p = 0,6364$). A análise estatística da comparação dos grupos que receberam risendronato com placebo mostrou significância somente na comparação A1 x R1 (ANOVA, *post hoc*

Dunnet, $p=0,0279$). Os demais grupos, R2 e R3, não foram significantes estatisticamente comparados com A1 (ANOVA, *post hoc* Dunnet, $p>0,05$)

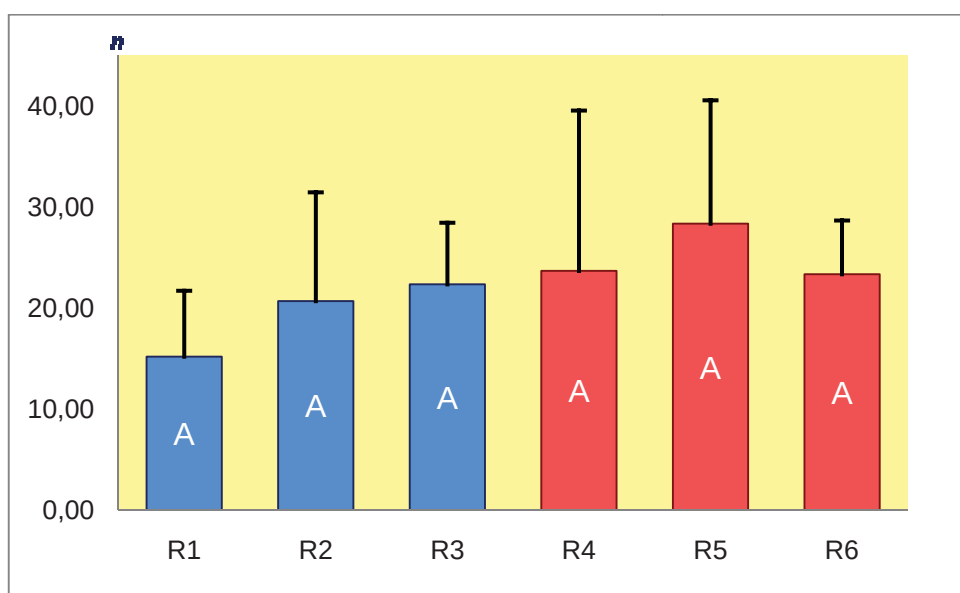


*: Difere estatisticamente do Grupo C2 (Teste comparativo de Dunnet);
n: número de células TRAP-positivas.

Figura 25 – Gráfico ilustrativo das médias e desvios-padrão referentes ao número de células TRAP-positivas do GU.

No GU, o grupo C2 exibiu a menor média nesse parâmetro e a comparação estatística como os demais foi significativa estatisticamente em relação ao A2 e R5. Ainda, a inferência estatística pelo teste ANOVA e posterior comparação de Dunnet, não mostrou diferenças na comparação entre os grupos que receberam risendronato do que recebeu placebo ($p<0,05$).

O gráfico contendo a estatística inferencial (ANOVA, *post hoc* Tukey) relacionado somente aos grupos que receberam risendronato para o número de células TRAP-positivas estão exibidos na figura 26.



*Letras iguais não diferem estatisticamente (ANOVA, post hoc Tukey).
n: número de células TRAP-positivas.*

Figura 26 – Gráfico ilustrativo das médias e desvios-padrão referentes ao número de células TRAP-positivas dos grupos de animais que receberam risendronato.

Pelo teste ANOVA, não se verificou significância estatística em relação as dosagens ($p=0,3781$), ao número de aplicações ($p=0,0785$) e na interação desses parâmetros ($p=0,55$). Da mesma forma, a comparação múltipla pelo teste de Tukey não mostrou diferenças estatísticas nos grupos R1 a R6 em relação ao número de células TRAP-positivas. O grupo R1 exibiu a menor média (15,17) e o grupo R5 a maior (28,33). Nota-se que nos grupos R1, R2 e R3, o aumento das células TRAP positivas exibiu tendência de dose-dependência, semelhante ao observado nos parâmetros anteriores. No entanto, nos grupos R4, R5 e R6, pertencentes ao GU, não se observou essa dose-dependência, visto que o grupo R5 exibiu a maior média, seguido do grupo R4 e o R6 com a menor dos três. Ainda, notou-se que, principalmente nos grupos R4 e R5, a variação da marcação foi ampla, confirmado pelos altos valores de desvios-padrão exibidos.

6 DISCUSSÃO

O modelo experimental de indução de doença periodontal em ratos através da inserção de ligaduras de algodão, seda ou *nylon* na região cervical de molares tem sido amplamente utilizado e relatado na literatura (Nowotny, Sanavi, 1983; Koide et al., 1995; Peruzzo et al., 2010). Modelos experimentais semelhantes foram utilizados em outras espécies (Schroeder, Lindhe, 1975; Weinreb et al., 1994).

A presença da ligadura inserida no sulco gengival promove uma rápida colonização bacteriana além de causar injúria traumática, alterando a patogenicidade, tornando o processo de reabsorção óssea mais rápido associado a uma resposta inflamatória aguda (Nyman et al., 1979). Ainda, a ligadura causa ulceração do epitélio da margem gengival facilitando a penetração de bactérias e seus subprodutos permitindo uma intensa interação hospedeiro-biofilme.

Segundo Weeks-Dybvig et al., em 1982, o mecanismo pelo qual a ligadura inserida na cervical dos molares induz periodontite em animais envolve a injúria mecânica e presença de bactérias que promovem a liberação de grandes quantidades de mediadores inflamatórios, principalmente prostaglandinas, citocinas inflamatórias, como IL-1- β , TNF- α . Esses mediadores modificam o equilíbrio da remodelação óssea, aumentando a formação e ativação de osteoclastos bem como inibindo a função osteoblástica, o que invariavelmente leva à destruição do tecido conjuntivo e reabsorção óssea (Gemmell et al., 1997).

Em nosso estudo a presença de ligadura foi eficaz em provocar perda óssea alveolar após 15 dias, quando observamos os parâmetros histomorfométricos e histológicos dos grupos controle sem

ligadura e placebo. Os valores médios mostram que os grupos A1 e A2 exibiram perda óssea em média 10 vezes maior que a espessura do ligamento periodontal normal. Inúmeras alterações histológicas puderam ser verificadas principalmente pela intensa presença de osteoclastos e lacunas de reabsorção e ampliação dos espaços medulares.

O tempo de eutanásia dos animais, após 15 dias de indução da doença, se baseou nos estudos de evolução da periodontite que indicam que após 7 dias a doença tem seu pico de inflamação e perda óssea e aos 15 esse processo se estabiliza, se mantendo mesmo após 60 dias (Kuhr et al., 2004). Isso ocorre porque com a progressão da doença, a margem gengival migra apicalmente, fazendo com que a ligadura já não exerça injúria física e a formação de placa nessa região não interfira no processo de doença.

O primeiro molar inferior do rato apresenta 4 raízes sendo mesial, distal, vestibular e lingual. Os espécimes analisados em nosso estudo foram obtidos após o término da raiz vestibular, na qual se pode observar o osso inter-radicular. Portanto, a escolha dessa área para as análises dos parâmetros baseou-se no fato que o osso dessa área inter-radicular não é tão exposto aos efeitos traumáticos exercidos pela ligadura, como ocorre nos processos alveolares vestibulares e linguais (Goya et al., 2006).

De maneira geral, os bifosfonatos (BFs) são empregados em situações clínicas em que ocorre um desequilíbrio do mecanismo entre a formação e a reabsorção óssea, bem como para o tratamento de muitas doenças ósseas, principalmente daquelas ligadas ao metabolismo ósseo (Duarte et al., 2004; Rocha et al., 2004; Lipton, 2008; Silverman, 2008; Landesberg et al., 2009).

Os completos mecanismos de ação dos bifosfonatos no tecido ósseo ainda permanecem incertos. Entretanto, nos últimos anos muito se avançou nas pesquisas, e sabe-se que basicamente se ligam a parte mineral do osso e quando do processo de reabsorção óssea são

absorvidos pelos osteoclastos, induzem alterações bioquímicas nessas células, incluindo perda da capacidade reabsortiva, e apoptose (Russell, 1999). Além disso, os BFs podem atuar diretamente nos osteoclastos, o que provavelmente, desencadeia alterações na morfologia celular, como modificações no citoesqueleto e na borda ondulada (Fleisch, 1997). Outros mecanismos ainda são especulados, como a ativação direta em osteoblastos seja atuando no sistema RANK/RANKL/OPG e consequentemente redução no recrutamento de osteoclastos ou até estimulando a formação óssea (D'Aoust et al., 2000; Zhou et al., 2010).

O risendronato de sódio (RS) é um aminobifosfonato de terceira geração que apresenta um átomo de nitrogênio no anel heterocíclico e cuja capacidade antirreabsortiva é de aproximadamente 1.000 vezes maior que os de primeira geração (Crandall, 2001; Bobba, Adachi, 2007). A razão para a eleição desse BF em nosso presente estudo se baseou nessa maior capacidade de inibição de reabsorção óssea e também porque até os dias de hoje não foram encontrados estudos que relacionem o uso local do risendronato e a doença periodontal experimental em ratos.

Embora esteja bem documentado na literatura que a administração sistêmica dos BFs seja eficaz na prevenção e tratamento de doenças ósseas, o uso desses fármacos tópicos principalmente na periodontite torna-se uma opção interessante pela facilidade de aplicação além de reduzir consideravelmente os efeitos sistêmicos indesejados (Goya et al., 2006). Portanto, optamos por utilizar uma abordagem local do risendronato de sódio com objetivo de observar se esse fármaco era capaz não só de inibir a reabsorção óssea causada pela ligadura como também promover a neoformação óssea.

Diversos tipos de abordagens locais com BFs foram estudados na literatura, tais como géis (Reddy et al., 2005), esponjas embebidas (Yalle et al., 2000), dispositivos de liberação lenta (Srisubut et al., 2007), e soluções (Mitsuta et al., 2002; Goya et al., 2006). Optou-se

nesse trabalho pela irrigação de uma solução contendo o fármaco, pois sendo o risendronato um sal, a sua dissolução em água é possível sem alterar suas propriedades químicas, além disso, a irrigação subgengival é amplamente utilizada na prática da periodontia, sendo facilitada sua utilização clínica (Hoang et al., 2003).

As dosagens por nós empregadas foram escolhidas observando-se os resultados de trabalhos semelhantes na literatura. Weinreb et al., em 1994, mostraram que o uso do alendronato sistêmico em doses mais baixas (0,05 mg/Kg) foram mais eficazes que doses maiores (0,25 mg/kg) na inibição da perda óssea alveolar na periodontite experimental em macacos. Mitsuta et al., 2002, mostraram que das três doses utilizadas de clodronato em uso tópico, 20, 40 e 60 mM, apenas as duas últimas mostraram diferenças estatísticas em relação ao controle na densidade mineral óssea e perda óssea alveolar na periodontite induzida em ratos. Similarmente, Alencar et al., 2002, verificaram que os grupos que receberam doses maiores, 25 mg/kg e 5 mg/kg de clodronato foram superiores os que receberam 1 mg/kg e placebo na redução da perda óssea alveolar em ratos.

Portanto, escolhemos inicialmente a menor dose baseada na conversão da dosagem semanal usada para humanos de risendronato (35 mg para 70 kg) para a dosagem semanal proporcional a massa do animal (0,125 mg ou 0,025 mg/kg considerando a massa média dos animais aproximadamente 200 g). As outras dosagens se basearam na primeira e representam o dobro e o quádruplo dessa dose inicial. O objetivo dessas concentrações maiores foi verificar a capacidade reabsortiva e a procura da dosagem ótima, além também de observar aspectos histológicos relacionados a possíveis alterações deletérias inerentes a superdosagens.

Os tempos e a quantidade de aplicação dos fármacos empregados nesse trabalho basearam-se em alguns fatores: A dupla aplicação, aos 5 e 10 dias tinha como intuito observar o efeito do

risendronato nas fases mais iniciais da doença e o papel de aplicações repetidas (Cetinkaya et al., 2008). Já a aplicação única aos 10 dias objetivava verificar como atuaria o medicamento com a doença instalada. Comparando-se a idade dos animais com humanos, o período de observação de 15 dias corresponde a aproximadamente 8-9 meses (Quinn, 2005). Dessa forma levando-se em conta que a doença periodontal experimental em ratos a partir de 15 dias não se altera de forma considerável, acreditamos que os tempos analisados foram suficientes para se observar os efeitos do fármaco adotado nas duas abordagens temporais de aplicação.

O efeito da terapia com bifosfonatos tanto sobre a densidade óssea alveolar como sobre a inibição da perda óssea na periodontite tem sido extensamente investigados em modelos experimentais (Brunsvold et al., 1992; Shoji et al., 1995; Yaffe et al., 2000, Duarte et al., 2006; Spolidorio et al., 2007) e também através de estudos clínicos (Rocha et al., 2001; Lane et al., 2005). Entretanto, os resultados são conflitantes em relação principalmente às dosagens, aos períodos de administração e aos veículos aplicados.

Observando-se os resultados obtidos nesse estudo verificamos que a periodontite experimental alterou consideravelmente o volume trabecular da crista óssea inter-radicular remanescente (VtC). Os grupos controle sem doença (C1 e C2) exibiram médias respectivamente de 82,63% e 82,17%, em contrapartida, os grupos controle com ligadura (A1 e A2) obtiveram médias respectivamente de 54,41% e 55,15%. Essa alteração no trabeculado ósseo foi acompanhada por alterações morfológicas verificadas na análise descritiva, como o aumento do número e tamanho dos espaços medulares e a presença de numerosos osteoclastos. Os grupos que receberam risendronato, independentemente da dose administrada, exibiram valores de 13 a 15% maiores se comparado com os que receberam placebo, sendo significativo estatisticamente. Entretanto, mesmo com o tratamento, o volume

trabecular da crista óssea remanescente desses grupos foi inferior em média de 20 a 25% aos grupos que não receberam ligadura.

Outros autores também verificaram os efeitos de BFs no tecido ósseo alveolar. Reddy et al., em 1995, avaliaram o efeito do alendronato sistêmico (3 mg/Kg por semana) na periodontite ocorrida naturalmente em cães *beagle*. Após uma fase inicial para a instalação da doença, os animais foram tratados por 6 meses com o medicamento ou placebo. Os resultados mostraram que, análises de subtração radiográfica digital evidenciaram que os animais tratados com o BF exibiram maior massa óssea significativa estatisticamente que os que receberam placebo.

Tani-Ishii et al., em 2003, avaliaram o efeito do incadronato na progressão da periodontite experimental em ratos. Um dos parâmetros analisados foi a densidade mineral do osso alveolar remanescente através de análises radiográficas. Os resultados mostraram que apenas o tratamento de longa duração (8 semanas) foi eficaz em alterar significativamente a densidade mineral do osso cortical e esponjoso em respectivos valores médios de 15,32% e 13,72% maiores que o grupo que recebeu placebo. Ainda, comparativamente esses resultados foram semelhantes aos encontrados no grupo sem doença. A dose total utilizada foi de 32 mg/kg em 8 semanas de tratamento.

Duarte et al., em 2006, avaliaram a densidade óssea do processo alveolar de ratas ovariectomizadas e submetidas a três diferentes tratamentos, calcitonina, estrógeno ou alendronato por 80 dias. A densidade óssea do grupo ovariectomizado que não recebeu tratamento foi 24,22% menor que o grupo sham e 33,18% menor que grupo ovariectomizado tratado com alendronato, ou seja, os animais que receberam o bifosfonato exibiram valores superiores até que os animais não ovariectomizados. Nesse estudo a dose total utilizada foi aproximadamente de 220 mg/kg após 80 dias.

Spolidorio et al., 2007, investigaram o efeito do alendronato na perda óssea alveolar induzida pela ciclosporina. Após 60

dias, os resultados mostraram que os animais que só receberam ciclosporina exibiram marcada redução no volume ósseo comparado ao controle sem o medicamento. Entretanto, os animais que receberam ciclosporina e alendronato exibiram valores semelhantes ou discretamente superiores ao controle. A dose total utilizada nesse estudo foi aproximadamente 2,4 mg/Kg.

A comparação dos resultados obtidos nesse parâmetro com os da literatura é dificultada por uma variedade de fatores. Primeiramente os processos de indução de perda óssea são diferentes, sendo que determinado procedimento pode alterar mais ou menos a arquitetura óssea comparado com outro. Outra variável são os tipos de análises do volume ósseo ou densidade óssea alveolar. Além disso, os trabalhos supracitados utilizam o tratamento sistemicamente, diferentemente da nossa investigação na qual o uso foi local. Finalmente, as dosagens utilizadas e os tempos de acompanhamento são amplamente variados.

Entretanto, em relação aos efeitos dos bifosfonatos sobre o osso alveolar algumas considerações podem ser realizadas. Em primeiro lugar, todos os estudos acima indicaram que os BFs alteraram o *turnover* ósseo somente na presença de perda óssea instalada. Ou seja, na ausência de perda óssea, o tratamento com BFs não alterou nem o volume, nem a arquitetura óssea. No entanto, nos processos em que houve significativa agressão ao tecido ósseo, os BFs, na maioria dos casos, preveniram alterações significativas ou em alguns até anularam o efeito agressor inicial. Corroborando com essa idéia, Altundal e Güvener, em 2004, avaliaram o uso do alendronato em parâmetros histométricos do osso alveolar após a extração dentária em ratos. Concluíram que após 14 e 28 dias os grupos que receberam alendronato exibiram maiores valores de espessura óssea que os receberam salina e afirmaram que a absorção do BF foi maior nos sítios em que a remodelação óssea foi mais ativa.

Considerando-se as dosagens, os estudos parecem indicar que doses elevadas e ou períodos de administração maiores são necessários para alterar profundamente a arquitetura óssea frente a algum processo de agressão. (Tani-Ishii et al., 2003; Duarte et al., 2006) No entanto, no presente estudo, utilizou-se doses consideravelmente mais baixas que os outros trabalhos citados, mas aplicados localmente, o que de certa forma aumentou quantidade de moléculas que entraram em contato com o tecido ósseo. Mesmo assim, o grupo que apresentou o maior valor foi o R3, na qual utilizamos a maior dose (0,5 mg) em duas aplicações, sem no entanto diferir estatisticamente dos demais grupos na qual se administrou risendronato. Entretanto, autores sugerem que mais estudos são necessários para avaliar os efeitos dos BFs nos osso alveolar (Brunsvold et al., 1992; Shoji et al., 1995; Yaffe et al., 2000; Tani-Ishii et al., 2003; Duarte et al., 2006; Spolidorio et al., 2007).

Para avaliar os efeitos da ação local do risendronato na inibição da perda óssea alveolar dois parâmetros foram analisados nesse estudo, o volume trabecular da área de furca (VtF) e a distância linear da furca à crista óssea (DL). Em ambos o comportamento foi semelhante ao verificar-se que o risendronato foi mais eficaz que o placebo na redução da perda óssea e que esse benefício foi dose-dependente. Os grupos nos quais foram aplicadas doses menores (R1 e R4) apresentaram resultados superiores do que aqueles que receberam doses intermediárias (R2 e R5), que por sua vez foram melhores que os animais tratados com as maiores doses (R3 e R6). Em termos de valores percentuais, considerando-se o parâmetro DL, em média, o grupo R1 apresentou 35,23% menos perda óssea que o grupo A1, e o grupo R4 exibiu 36,47% menos perda óssea que o grupo A2.

A maior parte dos estudos envolvendo ação sistêmica e local de bifosfonatos na prevenção da perda óssea decorrente de periodontite experimental ou ocorrida naturalmente em animais tem mostrado efeitos benéficos (Brunsvold et al., 1992; Reddy et al., 1995;

Shoji et al., 1995; Yaffe et al., 1997; Binderman et al., 2000; Kaynak et al., 2000; Yaffe et al., 2000; Mitsuta et al., 2002; Tani-Ishii et al., 2003; Duarte et al., 2004; Menezes et al., 2005; Goya et al., 2006; Cetinkaya et al., 2008). Outros três estudos não mostraram benefícios significantes dos BFs quando usados isoladamente, porém quando associados à doxiciclina modificada exibiram sinergia e foram eficazes em inibir a perda óssea periodontal e reduzir índices de metaloproteinases (Llavaneras et al., 2001; Buduneli et al., 2005; Buduneli et al., 2007).

Goya et al., 2006, pesquisaram o efeito da aplicação tópica do olpadronato monossódico na periodontite experimental em ratos. Após indução da doença pela inserção da ligadura, os animais receberam diariamente 0,1 ml contendo 150 mM do BF ou placebo por 4 dias, quando foram submetidos à eutanásia. Os resultados histomorfométricos mostraram que o grupo que recebeu olpadronato apresentou perda óssea na região de furca de 288,8 μ m contra 509,4 μ m do grupo placebo, resultando numa diferença de 220,6 μ m. Em nosso estudo, verificamos que o grupo R1 exibiu 418,30 μ m contra 1187,1 μ m do grupo A1, e uma diferença entre os grupos de 768,8 μ m. Essa maior diferença pode ser atribuída ao período de acompanhamento, 4 dias no primeiro estudo e 15 dias em nosso. Ainda, os autores concluíram que o olpadronato aplicado nas fases iniciais do processo inflamatório foi eficaz em reduzir, mas não eliminar, a perda óssea alveolar decorrente de periodontite experimental.

Entretanto, comparando-se os resultados de todos os grupos experimentais com os grupos C1 e C2, verificamos que mesmo atenuando a perda óssea, o risendronato não inibiu totalmente a reabsorção de osso alveolar decorrente da periodontite experimental. Esse achado foi encontrado na maioria dos estudos encontrados na literatura que associam o uso de BFs e periodontite em animais (Alencar et al., 2002; Duarte et al., 2004; Buduneli et al., 2005; Goya et al., 2006; Cetinkaya et al., 2008), no entanto a inibição total, na qual os níveis

ósseos após a indução da periodontite exibiam valores próximos ao do periodonto normal, foi encontrada em dois trabalhos com macacos (Brunsvold et al., 1992; Weinreb et al., 1994) e em um estudo na qual houve associação de um BF com doxiciclina modificada (Llavaneras et al., 2001).

Dessa maneira, nossos resultados são semelhantes com a maioria dos estudos anteriores que investigaram o efeito de BFs na inibição da perda óssea em modelos experimentais de periodontite. Entretanto, quando observamos os efeitos das diferentes dosagens do risendronato na perda óssea, verificamos que menores doses foram as mais eficazes. O efeito das diferentes concentrações e os períodos de administração tem sido objetivo de alguns trabalhos.

Dos trabalhos que investigaram a ação local de BFs na doença periodontal, apenas 2 testaram diferentes dosagens, e em ambos, os melhores resultados foram obtidos com as maiores doses.

Binderman et al. 2000, estudaram o efeito local de 4 concentrações de alendronato (0,01, 0,05, 0,2 ou 0,4 mg) na reabsorção óssea alveolar induzida por retalho mucoperiosteal. Os resultados mostraram que as doses maiores foram mais eficazes na redução da perda óssea. Resultados semelhantes foram observados por Mitsuta et al., 2002, que pesquisaram o efeito local de 3 concentrações de clodronato (20, 40 e 60 mM) na reabsorção óssea periodontal induzida. Os autores concluíram que apenas os grupos nos quais foram aplicados 40 ou 60 mM do BF obtiveram valores superiores significantes estatisticamente comparados com placebo na inibição da reabsorção óssea e na redução de osteoclastos.

No entanto, nosso estudo evidenciou que as três doses testadas foram mais eficazes que o placebo e que os grupos que receberam doses menores (0,125 mg) foram mais eficazes em prevenir a perda óssea alveolar. Comparativamente os melhores resultados obtidos com as doses de 0,2 e 0,4 mg no estudo de Binderman et al., 2000, são

próximos como os obtidos com as doses de 0,125 mg e 0,25 mg aplicados nesse trabalho, visto que nos grupos R1 e R2 foram duas aplicações, totalizando 0,25 e 0,5 mg respectivamente.

Em relação aos estudos nos quais se investigou o uso sistêmico de diferentes dosagens de BFs na periodontite experimental, cinco estudos foram encontrados, sendo que em dois verificou-se o maior benefício em doses menores (Brunsvold et al., 1992; Weinreb et al., 1994), em outros dois em doses maiores (Alencar et al., 2002; Menezes et al., 2005) e em um não houve diferenças entre as doses nos períodos curtos de administração (Cetinkaya et al., 2008).

Weinreb et al., 1994, induziram doença periodontal através de ligaduras e inoculação de *Porphyromonas gingivalis* em macacos e avaliaram o efeito de duas dosagens diferentes de alendronato (0,05 mg/kg ou 0,25 mg/kg). Os resultados mostraram que o grupo que recebeu a menor dose (0,05 mg/Kg) exibiu os melhores resultados e os autores concluíram que os mecanismos para a resposta bifásica desse medicamento ainda necessitam maiores esclarecimentos, entretanto que doses maiores das preconizadas para o tratamento da osteoporose podem ser necessárias para o tratamento de doenças osteolíticas.

Menezes et al., 2005, avaliaram o efeito de 3 dosagens de alendronato (0,01; 0,05; 0,25 mg/Kg/diário) em duas abordagens diferentes (preventivo ou profilático) na progressão da periodontite induzida por ligaduras em ratos. Os animais dos grupos preventivos receberam o BF concomitantemente a indução da doença e foram eutanasiados após 11, dias. O grupo profilático só recebeu a maior dose (0,25 mg/kg) que foi iniciada após 5 dias de indução da periodontite e os animais foram sacrificados aos 11 dias. Os resultados mostraram que os grupos que receberam a maior dose (0,25 mg/kg), tanto na primeira quanto na segunda abordagem foram mais eficazes na redução da perda óssea alveolar.

Além das doses, outros fatores a serem abordados, são os períodos e a quantidade de intervenções terapêuticas. Em nosso estudo, realizamos duas abordagens terapêuticas, a primeira, com duas aplicações, após 5 e 10 dias da indução da doença a e segunda, com única aplicação após 10 dias. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos com mesma dosagem em relação os períodos de intervenção. Dessa forma, mesmo após 10 dias, a aplicação de risendronato foi eficaz na inibição da perda óssea alveolar, sendo dose dependente. Em relação ao tipo de abordagem, profilática ou terapêutica, dois trabalhos existem na literatura e ambos não exibiram diferenças entre essas diferentes intervenções (Alencar et al., 2002; Menezes et al., 2005). No entanto, considerando-se a duração do tratamento, três estudos avaliaram o efeito dos BFs ao longo do tempo, e desses, um mostrou benefícios com tratamentos com curta duração (Cetinkaya et al., 2008), outro exibiu benefícios com tratamento de longa duração (Tani-Ishii et al., 2003) e em outro não houve diferenças entre os tratamentos de maior e menor duração (Duarte et al., 2004).

Cetinkaya et al., 2008, concluíram que o tratamento sistêmico com risendronato de curta duração (3 semanas) , independente da dose (0,1 ou 1 mg/Kg) foi mais eficaz que o de longa duração (8 semanas) na prevenção de perda óssea alveolar decorrente de periodontite induzida em ratas. Além disso, através de análise estereológica, os autores inferiram que o tratamento de longa duração e com alta dose foi capazes de reduzir o número de vasos sanguíneos e induzir alterações microscópicas no tecido ósseo.

Dessa forma, em relação aos achados histomorfométricos, nossos resultados são semelhantes com a maior parte da literatura ao mostrar que o uso local do risendronato de sódio foi eficaz na prevenção da perda óssea alveolar decorrente de periodontite experimental, no entanto em relação a dose, a literatura não é unânime,

mas corrobora com os trabalhos os quais exibem que doses menores em períodos curtos trouxeram mais benefícios.

Na periodontite, fatores microbianos, como LPS e imunoinflamatórios do hospedeiro, como citocinas e prostaglandinas, possuem a capacidade de ativar os osteoclastos aumentando a reabsorção óssea. Os efeitos dos BFs nos osteoclastos incluem redução no recrutamento, diminuição de sua capacidade de adesão ao tecido ósseo, alterações morfológicas como perda de sua borda ondulada e por consequência, indução a apoptose. Esses efeitos reduzem a reabsorção óssea e alteram o turnover do tecido ósseo (Russell et al., 2007).

A TRAP é um marcador bioquímico específico para osteoclastos maduros e pré-osteoclastos. Na literatura são encontrados vários estudos que associam o aumento da expressão desse marcador em sítios com doença periodontal (Crotti et al., 2003; Fujita et al., 2008; Feitosa et al., 2009). Corroborando com essas informações, observamos que grupos com indução da periodontite apresentaram maiores números de células TRAP-positivas que o grupo controle sem doença (C1 e C2), sendo estatisticamente significante, exceto no grupo R1.

O grupo R1 exibiu redução significativa estatisticamente comparada com os que receberam placebo. Outros trabalhos que avaliaram *in vitro* ou *in vivo* o efeito de BFs nas células óssea também mostram redução da TRAP (Nishikawa et al., 1996; Van Beek et al., 2002; Mehlhorn et al., 2008; Weinstein et al., 2009; Xiong et al., 2010).

Na periodontia, existem escassos trabalhos que associam TRAP e BFs. Spolidorio et al., 2007, demonstraram que o tratamento com alendronato reduziu as células TRAP-positivas no periodonto comparada com placebo em animais que receberam ciclosporina, fármaco imunossupressor que induz perda óssea.

Mitsuta et al., 2002, concluíram que as 3 concentrações usadas de clodronato (20, 40 e 60 mM) foram eficazes em reduzir o número de células TRAP-positivas, sem no entanto exibir nenhuma dose-

dependência. Baseados nos resultados desse trabalho, observamos que apenas o grupo R1, que recebeu a menor dose, exibiu diferença estatística em relação ao placebo. Outros trabalhos também mostraram que apesar de inibir a perda óssea, o tratamento com BF não reduziu o número de osteoclastos, ou até provocaram sua elevação (Endo et al., 1993; Marshall et al., 1993; Shoji et al., 1995; Srisubut et al., 2007).

A relação da dose dos BFs e a influência na expressão da TRAP foi estudada por Zhao et al., em 2000, na qual avaliaram o efeito de um aminobifosfonato (YM175) em 3 concentrações (0,01; 0,1 ou 1 mg/kg por dia) na perda óssea na artrite induzida em ratos. Os resultados mostraram que nas três dosagens o BF foi eficaz na prevenção da perda óssea, no entanto, o grupo que recebeu a maior dose mostrou melhores benefícios. Em nosso estudo, a comparação entre os grupos que receberam risendronato não mostraram diferenças estatísticas em relação ao TRAP.

Além da marcação da TRAP, outras características observadas nesse trabalho em relação aos osteoclastos foram os aspectos histológicos. Em todos os grupos na qual foi induzida a periodontite, foram observados numerosas áreas de reabsorção e múltiplos osteoclastos. Entretanto, principalmente nos grupos R1, R2 e R4, foram notados osteoclastos não aderidos ao osso e com aspectos morfológicos alterados e indicativos de apoptose, como núcleos fusiformes e perda de integridade citoplasmática. Nos grupos controle e placebo essas características não foram notadas.

Goya et al., 2006 concluíram que o número de osteoclastos nos grupos tratados topicamente com olpadronato foi ligeiramente superior aos observados no grupo placebo na periodontite experimental em ratos. Entretanto, notaram que os osteoclastos do grupo teste exibiam menor adesão ao osso, perda de polaridade, ausência de borda ondulada e sinais citoplasmáticos indicativos de apoptose. Outras pesquisas também mostraram observações semelhantes, relacionadas ao

tratamento da doença periodontal com BFs e o número e a morfologia de osteoclastos. (Kaynak et al., 2000; Mitsuta et al., 2002; Cetinkaya et al., 2008).

Escudeiro et al., 2009, estudaram o efeito do olpadronato monossódico em parâmetros histomorfométricos e na expressão de RANKL, TUNEL e TRAP nos osteoblastos e megacariócitos de tíbias e fêmures de ratas. Após 6 semanas, observaram que o número e o volume dos osteoclastos foi significativamente superior no grupo do BF, mas a marcação de células TRAP positiva foi semelhante. Ainda, a expressão de TUNEL, marcador de apoptose celular, foi estatisticamente superior nos animais que receberam olpadronato. O RANKL mostrou-se mais expresso em osteoclastos com morfologia apoptótica e nos megacariócitos a marcação maior ocorreu no grupo teste. Os autores discutem que o aumento do número de osteoclastos observado no grupo teste pode ser causado pelo aumento da expressão de RANKL, principalmente nos próprios osteoclastos apoptóticos e nos megacariócitos.

Dessa maneira, é possível afirmar que em nosso estudo a periodontite induzida aumentou o número e a expressão da TRAP nos osteoclastos. O tratamento local com risendronato com a menor dose em duas aplicações reduziu as células TRAP positivas comparado com placebo, mas não diferiu significativamente dos demais grupos em que se empregou o BF. No entanto, nos grupos teste foram notadas alterações celulares indicativas de apoptose nos osteoclastos, não observadas nos grupos placebo.

Para verificar os efeitos do risendronato local na formação óssea, optamos por determinar a imunomarcação da osteocalcina (OCC) nos tecidos dentais e periodontais sob a ação dos diferentes tratamentos aqui aplicados. A osteocalcina, proteína encontrada abundantemente nos tecidos mineralizados, é um marcador de formação óssea (Lian, Gundberg, 1988; Franceschi, 1999). Portanto, maior expressão de OCC

nos tecidos ósseos evidencia maior atividade formadora (Boanini et al., 2008; Shiraki et al., 2010; Wang et al., 2010).

Na periodontite, estudos em humanos que têm investigado a relação da osteocalcina com sítios sadios e doentes mostraram resultados contrastantes (Konimatsu et al., 1993; Lee et al., 1999). Nesse presente estudo, a imunomarcagem da OCC, principalmente nas células e estruturas do tecido ósseo, foram semelhantes nos grupos controle sem doença e placebo, indicando que a periodontite, por si só, pouco alterou a expressão dessa proteína. Outros estudos em animais também mostraram níveis similares de osteocalcina em sítios sadios e doentes (Vardar-Sengül et al., 2006; Spolidorio et al., 2010).

Contudo, diferenças marcantes foram observadas na expressão da OCC nos grupos tratados com risendronato. A principal diferença foi observada nos osteoblastos, que especialmente nos animais do grupo R1 apresentaram-se com maior intensidade de marcação quando comparado com os grupos A1 e A2. Os demais grupos tratados com risendronato também apresentaram maior expressão de OCC nos osteoblastos comparados com placebo, porém em menor grau. Esses resultados concordam com parte da literatura que estudaram os efeitos de BFs na ativação da formação óssea e nos níveis de OCC (Im et al., 2004; Altundal et al., 2005; Boanini et al., 2008; Shiraki et al., 2010; Wang et al., 2010). Outros autores mostraram, entretanto, que os BFs podem ser inertes aos osteoblastos ou até inibitórios no processo de osteogênese (Idris et al., 2008; Orriss et al., 2009).

Uma das possibilidades desse comportamento bifásico dos BFs observada na literatura pode ser a dose. Orriss et al., 2009, testaram três BFs (clodronato, ibandronato e zolendronato) em diferentes dosagens e seus efeitos sobre culturas de osteoblastos além de suas atividades secretoras. Os autores concluíram que nas concentrações mais elevadas, os BFs mostraram comportamento inibitórios para os osteoblastos. Giuliani et al., 1998, verificaram que concentrações

menores de alendronato aumentaram a UFC (unidade formadora de colônias) de fibroblastos e osteoblastos em culturas de medula óssea humana e de ratos. Interessantemente em nosso estudo, a maior expressão da OCC nos osteoblastos foi obtida no grupo R1, na qual se utilizaram a menor dose, aplicada duas vezes. Outros trabalhos também evidenciaram maiores benefícios obtidos com doses menores de BFs, relacionados a osteoblastos (Reinholz et al., 2000; Frediani et al., 2004; Naidu et al., 2008)

Naidu et al., 2008, avaliaram 3 concentrações de alendronato e zoledronato na viabilidade celular e nas propriedades secretoras de osteoblastos de ratas e concluíram que nas maiores doses, os BFs foram citotóxicos, já nas menores estimularam a produção de TGF- β 1. A possível relação entre os BFs e a estimulação da formação óssea pode ser em parte explicada pelo aumento da expressão do TGF- β 1, pois, segundo esses autores esse fator de crescimento pode induzir a proliferação de osteoblastos, a produção de colágeno e outras proteínas da matriz óssea, como a osteopontina e fibronectina. Outros mecanismos têm sido propostos na literatura, no entanto, pesquisadores sugerem maior aprofundamento para que se esclareçam os efeitos dos BFs em osteoblastos e na formação óssea (Mathov et al., 2001; Viereck et al., 2002; Chaplet et al., 2004; Valenti et al., 2010).

Da mesma maneira, a análise descritiva mostrou presença de áreas com trabéculas ósseas imaturas, maior número de osteoblastos e osteócitos volumosos, indicativos de osso neoformado nos animais do grupo teste, principalmente com as menores doses. Essas características, aliadas as descritas na análise imuno-histoquímica nos permitem afirmar que o risendronato local promoveu maior ativação dos osteoblastos nos defeitos periodontais e por consequência, a formação óssea foi mais evidente nesses grupos.

A imunomarcação dos cementoblastos em todos os grupos está de acordo com a literatura que evidencia que a osteocalcina

pode ser produzida nessas células (Inubushi et al., 2008; Hakki et al., 2010). No entanto, a expressão tanto nos cementoblastos, quanto na matriz cementária ocorreu com maior intensidade nos grupos teste, especialmente no R1, R2 e R4. Em vista disso, podemos inferir que o uso local do risendronato por ativar a produção de cemento pode ser útil nos tratamentos periodontais regenerativos. Tenenbaum et al., 2002, afirmaram que um dos usos potenciais dos BFs na periodontia é a participação nos processos regenerativos entretanto, mais estudos ainda são necessários para melhor elucidação dos mecanismos de ação desses fármacos no comportamento das células do ligamento periodontal.

Além disso, após análise histológica, observamos que os animais que receberam tratamento com o BF apresentaram menores áreas de reabsorção radicular que os grupos que receberam placebo. Trabalhos envolvendo o papel de BFs na movimentação ortodôntica ou no reimplante dental notaram esse mesmo efeito sobre as raízes dentais (Igarashi et al., 1996; Levin et al., 2001; Liu et al., 2004)

Interessantemente, outros trabalhos de nosso grupo de pesquisa que estudaram o uso local de BPs em outros defeitos ósseos que não os periodontais não mostraram benefícios no processo de reparo (Fernandes, 2006; Nobre et al., 2008; Cannetieri et al., 2009), apesar de exibir a formação de tecido ósseo extra-cortical em área distante da aplicação local. Isso pode ocorrer porque os mecanismos patogênicos da periodontite podem ser mais afetados pelo uso de BFs que o processo de reparo ósseo normal. Além de atuar diretamente sobre osteoclastos, alterando sua capacidade reabsortiva e possivelmente sobre osteoblastos, ativando atividade secretora, BFs podem alterar a expressão de metaloproteinases da matriz, enzimas relacionadas à remodelação tecidual, alterar a produção de citocinas e prostaglandinas e reduzir a atividade de neutrófilos (Teronen et al., 1999; Nakaya et al., 2000; Llavaneras et al., 2001; Menezes et al., 2005; Buduneli et al., 2007; Giannobile, 2008).

Diante dos resultados das diferentes análises, nosso estudo representa uma contribuição na modulação da resposta do hospedeiro, demonstrando os benefícios da aplicação local do risendronato na progressão da periodontite experimental em modelos animais. O efeito do uso tópico de BFs nos tecidos periodontais, principalmente na formação óssea, pode representar um novo avanço para a terapia periodontal no futuro. Ainda, pesquisas adicionais utilizando BFs locais, como adjuntos ao tratamento da doença periodontal inflamatória, bem como melhor elucidação desses fármacos no comportamento dos tecidos periodontais visando terapias regenerativas, necessitam ser realizados para que possam ser efetivamente considerados como nova modalidade terapêutica.

7 CONCLUSÃO

A análise dos resultados, sob as condições experimentais, possibilitou concluir que:

- a) o tratamento com risendronato foi eficaz por reduzir a perda óssea decorrente da periodontite, sendo que a menor dose provocou melhores resultados;
- b) o tratamento com risendronato aumentou o volume trabecular do osso alveolar remanescente nos animais com periodontite, independente da dose utilizada;
- c) o número de aplicações do medicamento (dupla e única) não interferiu nos resultados;
- d) o tratamento com a menor dose de risendronato em duas aplicações diminuiu o número de células TRAP-positivas;
- e) o uso local do risendronato foi capaz de influenciar a expressão da osteocalcina nos osteoblastos, especialmente nos grupos que receberam as menores doses.

8 REFERÊNCIAS*

Adami S, Zamberlan N. Adverse effects of bisphosphonates. A comparative review. *Drug Saf.* 1996 Mar;14(3):158-70.

Adeyemo WL, Reuther T, Bloch W, Korkmaz Y, Fisher JH, Zöller JE, et al. Healing of onlay mandibular bone grafts covered with collagen membrane or bovine bone substitutes: a microscopical and immunohistochemical study in the sheep. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008;37(7):651-9.

Alencar VB, Bezerra MM, Lima V, Abreu AL, Brito GA, Rocha FA, et al. Disodium chlodronate prevents bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2002 Mar;73(3):251-6.

Almazrooa SA, Woo SB. Bisphosphonate and nonbisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a review. *J Am Dent Assoc.* 2009 Jul;140(7):864-75.

Altundal H, Gursoy B. The influence of alendronate on bone formation after autogenous free bone grafting in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005 Mar;99(3):285-91.

Andreaskos E, Taylor PC, Feldmann M. Monoclonal antibodies in immune and inflammatory diseases. *Curr Opin Biotechnol.* 2002 Dec;13(6):615-20.

Anandarajah AP, Schwarz EM. Bone loss in the spondyloarthropathies: role of osteoclast, RANKL, RANK and OPG in the spondyloarthropathies. *Adv Exp Med Biol.* 2009;649(1):85-99.

* Baseado em: Comité of Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: simple references [homepage na internet]. Bethesda: US Nacional Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar.]. Disponível em http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Asou Y, Rittling SR, Yoshitake H, Tsuji K, Shinomiya K, Nifuji A, et al. Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoclasts, and resorption in ectopic bone. *Endocrinology*. 2001 Mar;142(3):1325-32.

Aubin JE, Bonnellye E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos Int*. 2000;11(11):905-13.

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

Bartold PM, Narayanan AS. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontol 2000*. 2006;40:29-49.

Binderman I, Adut M, Yaffe A. Effectiveness of local delivery of alendronate in reducing alveolar bone loss following periodontal surgery in rats. *J Periodontol*. 2000 Aug;71(8):1236-40.

Boanini E, Torricelli P, Gazzano M, Giardino R, Bigi A. Alendronate-hydroxyapatite nanocomposites and their interaction with osteoclasts and osteoblast-like cells. *Biomaterials*. 2008 Mar;29(7):790-6.

Bobba R, Adachi JD. Review of the safety and efficacy of risedronate for the treatment of male osteoporosis. *Clin Interv Aging*. 2007;2(3):275-82

Boch JA, Wara-aswapati N, Auron PE. Interleukin 1 signal transduction--current concepts and relevance to periodontitis. *J Dent Res*. 2001 Feb;80(2):400-7.

Bolton AE. Biologic effects and basic science of a novel immune-modulation therapy. *Am J Cardiol*. 2005 Jun 6;95(11A):24C-29C.

Boyce RW, Wronski TJ, Ebert DC, Stevens ML, Paddock CL, Youngs TA, et al. Direct stereological estimation of three-dimensional connectivity in rat vertebrae: effect of estrogen, etidronate and risedronate following ovariectomy. *Bone*. 1995 Feb;16(2):209-13.

Boyce BF, Yao Z, Xing L. Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2009;19(3):171-80.

Brehme CS, Roman S, Shaffer J, Wolfert R. Tartrate-resistant acid phosphatase forms complexes with alpha2-macroglobulin in serum. *J Bone Miner Res*. 1999 Feb;14(2):311-8.

Brunsvold MA, Chaves ES, Kornman KS, Aufdemorte TB, Wood R. Effects of a bisphosphonate on experimental periodontitis in monkeys. *J Periodontol*. 1992 Oct;63(10):825-30.

Buduneli E, Buduneli N, Vardar-Sengül S, Kardeşler L, Atilla G, Lappin D, et al. Systemic low-dose doxycycline and alendronate administration and serum interleukin-1beta, osteocalcin, and C-reactive protein levels in rats. *J Periodontol*. 2005 Nov;76(11):1927-33.

Buduneli E, Vardar-Sengül S, Buduneli N, Atilla G, Wahlgren J, Sorsa T. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, and laminin-5 gamma2 chain immunolocalization in gingival tissue of endotoxin-induced periodontitis in rats: effects of low-dose doxycycline and alendronate. *J Periodontol*. 2007 Jan;78(1):127-34.

Bull H, Murray PG, Thomas D, Fraser AD, Nelson PN. Acid phosphatases. *J Clin Pathol: Mol Pathol*. 2002;55(1):65–72.

Canettieri AC, Colombo CE, Chin CM, Faig-Leite H. Femur bone repair in ovariectomized rats under the local action of alendronate, hydroxyapatite and the association of alendronate and hydroxyapatite. *Int J Exp Pathol*. 2009 Oct;90(5):520-6.

Cetinkaya BO, Keles GC, Ayas B, Gurgor P. Effects of risedronate on alveolar bone loss and angiogenesis: a estereologic study in rats. *J Periodontol*. 2008 Oct;79(10):1950-61.

Chaplet M, Detry C, Deroanne C, Fisher LW, Castronovo V, Bellahcène A. Zoledronic acid up-regulates bone sialoprotein expression in osteoblastic cells through Rho GTPase inhibition. *Biochem J*. 2004 Dec 15;384 (Pt 3):591-8.

Chesnut CH. Treating osteoporosis with bisphosphonates and addressing adherence: a review of oral ibandronate. *Drugs*. 2006;66(10):1351-9.

Cohen J. Weighed kappa: Nominal scale agreement with provision for scaled disagreement or partial credit. *Psychol Bull*. 1968; 70(4):213–20.

Coleman R, Brown J, Terpos E, Lipton A, Smith MR, Cook R, et al. Bone markers and their prognostic value in metastatic bone disease: clinical evidence and future directions. *Cancer Treat Rev*. 2008 Nov;34(7):629-39.

Conraads VM, Bosmans JM, Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Bridts CH, Wuyts FL, et al. Effect of short-term treatment with pravastatin on cytokines and cytokine receptors in patients with chronic heart failure due to ischemic and nonischemic disease. *J Heart Lung Transplant*. 2005 Aug;24(8):1114-7.

Corral DA, Amling M, Priemel M, Loyer E, Fuchs S, Ducy P, et al. Dissociation between bone resorption and bone formation in osteopenic transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Nov;13835-40.

Crandall C. Risedronate: a clinical review. *Arch Intern Med*. 2001 Feb 12;161(3):353-60.

Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, et al. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontal Res*. 2003 Aug;38(4):380-7.

D'Aoust P, McCulloch CA, Tenenbaum HC, Lekic PC. Etidronate (HEBP) promotes osteoblast differentiation and wound closure in rat calvaria. *Cell Tissue Res.* 2000 Dec;302(3):353-63.

David P, Nguyen H, Barbier A, Baron R. The bisphosphonate tiludronate is a potent inhibitor of the osteoclast vacuolar H(+)-ATPase. *J Bone Miner Res.* 1996 Oct;11(10):1498-507.

Delima AJ, Oates T, Assuma R, Schwartz Z, Cochran D, Amar S, et al. Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001 Mar;28(3):233-40.

Delmas PD, Malaval L, Arlot ME, Meunier PJ. Serum bone Gla-protein compared to bone histomorphometry in endocrine diseases. *Bone.* 1985;6(5):339-41.

Duarte PM, de Assis DR, Casati MZ, Sallum AW, Sallum EA, Nociti FH Jr. Alendronate may protect against increased periodontitis-related bone loss in estrogen-deficient rats. *J Periodontol.* 2004 Sep;75(9):1196-202.

Duarte PM, Gonçalves P, Casati MZ, de Toledo S, Sallum EA, Nociti FH Jr. Estrogen and alendronate therapies may prevent the influence of estrogen deficiency on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *J Periodontal Res.* 2006 Dec;41(6):541-6.

Eastell R, Hannon RA. Biomarkers of bone health and osteoporosis risk. *Proc Nutr Soc.* 2008 May;67(2):157-62.

Ek-Rylander B, Flores M, Wendel M, Heinegård D, Andersson G. Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro. *J Biol Chem.* 1994 May 27;269(21):14853-6.

Elliott MJ, Maini RN. New directions for biological therapy in rheumatoid arthritis. *Int Arch Allergy Immunol.* 1994;104(2):112-25.

El-Shinnawi UM, El-Tantawy SI. The effect of alendronate sodium on alveolar bone loss in periodontitis (clinical trial). *J Int Acad Periodontol*. 2003 Jan;5(1):5-10.

Endo Y, Nakamura M, Kikuchi T, Shinoda H, Takeda Y, Nitta Y, et al. Aminoalkylbisphosphonates, potent inhibitors of bone resorption, induce a prolonged stimulation of histamine synthesis and increase macrophages, granulocytes, and osteoclasts in vivo. *Calcif Tissue Int*. 1993 Mar;52(3):248-54.

Escudero ND, Lacave M, Ubios AM, Mandalunis PM. Effect of monosodium olpadronate on osteoclasts and megakaryocytes: an in vivo study. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2009 Apr-Jun;9(2):109-20.

Feitosa DS, Marques MR, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr, de Toledo S. The influence of thyroid hormones on periodontitis-related bone loss and tooth-supporting alveolar bone: a histological study in rats. *J Periodontal Res*. 2009 Aug;44(4):472-8.

Fernandes RG. Estudo da ação local do alendronato sódico, da hidroxiapatita e da associação do alendronato sódico com a hidroxiapatita, no reparo ósseo de fêmures de ratos [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos: UNESP - Univ Estadual Paulista; 2005.

Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action and clinical use in osteoporosis--an update. *Horm Metab Res*. 1997 Mar;29(3):145-50.

Fleiss JL. Statistical methods for rates and proportions. New York: John Wiley; 1981.

Fournier A, Morinière P, Ben Hamida F, el Esjer N, Shenovda M, Ghazali A, et al. Use of alkaline calcium salts as phosphate binder in uremic patients. *Kidney Int Suppl*. 1992 Oct;38:S50-61.

Franceschi RT. The developmental control of osteoblast-specific gene expression: role of specific transcription factors and the extracellular matrix environment. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(1):40-57.

Frediani B, Spreafico A, Capperucci C, Chellini F, Gambera D, Ferrata P, et al. Long-term effects of neridronate on human osteoblastic cell cultures. *Bone*. 2004 Oct;35(4):859-69.

Fujita S, Kikuchi T, Sobue T, Suzuki M, Koide M, Noguchi T. Lipopolysaccharide-mediated enhancement of bone metabolism in estrogen-deficient mice. *J Periodontol*. 2008 Nov;79(11):2173-81.

Funayama H, Mayanagi H, Takada H, Endo Y. Elevation of histidine decarboxylase activity in the mandible of mice by *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide and its augmentation by an aminobisphosphonate. *Arch Oral Biol*. 2000 Sep;45(9):787-95.

Gallop PM, Lian JB, Hauschka PV. Carboxylated calcium-binding proteins and vitamin K. *N Engl J Med*. 1980 Jun 26;302(26):1460-6.

Ganguli A, Henderson C, Grant MH, Meikle ST, Lloyd AW, Goldie I. The interactions of bisphosphonates in solution and as coatings on hydroxyapatite with osteoblasts. *J Mater Sci Mater Med*. 2002 Oct;13(10):923-31.

Gebara SN, Moubayed H. Risk of osteonecrosis of the jaw in cancer patients taking bisphosphonates. *Am J Health Syst Pharm*. 2009 Sep 1;66(17):1541-7.

Gemmel E, Marshall RJ, Seymours GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol* 2000. 1997;14(1):112-43.

Genco RJ. Host responses in periodontal diseases: current concepts. *J Periodontol*. 1992 Apr; 63(4 Suppl):338-55.

Giannobile WV. Periodontal tissue engineering by growth factors. *Bone*. 1996 Jul;19(1 Suppl):23S-37S.

Giannobile WV. Host-response therapeutics for periodontal diseases. *J Periodontol*. 2008 Aug;79(8 Suppl):1592-600.

Giuliani N, Pedrazzoni M, Negri G, Passeri G, Impicciatore M, Girasole G. Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures in vitro and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo. *Bone*. 1998 May;22(5):455-61.

Golub LM, McNamara TF, D'Angelo G, Greenwald RA, Ramamurthy NS. A non-antibacterial chemically-modified tetracycline inhibits mammalian collagenase activity. *J Dent Res*. 1987 Aug;66(8):1310-4.

Gopalsami C, Yotis W, Corrigan K, Schade S, Keene J, Simonson L. Effect of outer membrane of *Treponema denticola* on bone resorption. *Oral Microbiol Immunol*. 1993 Apr;8(2):121-4.

Goya JA, Paez HA, Mandalunis PM. Effect of topical administration of monosodium olpadronate on experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2006 Jan;77(1):1-6.

Graves DT, Delima AJ, Assuma R, Amar S, Oates T, Cochran D. Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis. *J Periodontol*. 1998 Dec;69(12):1419-25.

Graziani F, Cei S, Guerrero A, La Ferla F, Vano M, Tonetti M, et al. Lack of short-term adjunctive effect of systemic neridronate in non-surgical periodontal therapy of advanced generalized chronic periodontitis: an open label-randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2009 May;36(5):419-27.

Gurgel BC, Duarte PM, Nociti FH Jr, Sallum EA, Casati MZ, Sallum AW, et al. Impact of an anti-inflammatory therapy and its withdrawal on the progression of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2004 Dec;75(12):1613-8.

Haerian A, Adonogianaki E, Mooney J, Docherty JP, Kinane DF. Gingival crevicular stromelysin, collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases levels in healthy and diseased sites. *J Clin Periodontol*. 1995 Jul;22(7):505-9.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 1994 Jun;5:78-111.

Hakki SS, Foster BL, Nagatomo KJ, Bozkurt SB, Hakki EE, Somerman MJ, et al. Bone morphogenetic protein-7 enhances cementoblast function in vitro. *J Periodontol*. 2010 Nov;81(11):1663-74.

Halleen JM, Räisänen S, Salo JJ, Reddy SV, Roodman GD, Hentunen TA, et al. Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J Biol Chem*. 1999 Aug 13;274(33):22907-10.

Hamill P, Brown K, Jenssen H, Hancock RE. Novel anti-infectives: is host defence the answer? *Curr Opin Biotechnol*. 2008 Dec;19(6):628-36.

Harris EF, Smith RN. Accounting for measurement error: a critical but often overlooked process. *Arch Oral Biol*. 2009 Dec;54 Suppl 1:S107-17.

Harris ST, Watts NB, Genant HK, McKeever CD, Hangartner T, Keller M, et al. Effects of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. Vertebral Efficacy With Risedronate Therapy (VERT) Study Group. *JAMA*. 1999 Oct 13;282(14):1344-52.

Hart TC, Kornman KS. Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000. 1997 Jun;14:202-15.

Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev*. 1989 Jul;69(3):990-1047.

Hoang T, Jorgensen MG, Keim RG, Pattison AM, Slots J. Povidone-iodine as a periodontal pocket disinfectant. *J Periodontal Res*. 2003 Jun;38(3):311-7.

Holt SC, Bramanti TE. Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1991;2(2):177-281.

Horton EW. The prostaglandins. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1972 Dec 5;182(69):411-26.

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 Mar;82(3):191-201.

Igarashi K, Adachi H, Mitani H, Shinoda H. Inhibitory effect of the topical administration of a bisphosphonate (risedronate) on root resorption incident to orthodontic tooth movement in rats. *J Dent Res*. 1996 Sep;75(9):1644-9.

Igarashi Y, Lee MY, Matsuzaki H. Acid phosphatases as markers of bone metabolism. *J Chromat*. 2002;781(3):345-58.

Im GI, Qureshi SA, Kenney J, Rubash HE, Shanbhag AS. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials*. 2004 Aug;25(18):4105-15.

Inubushi T, Tanaka E, Rego EB, Kitagawa M, Kawazoe A, Ohta A, et al. Effects of ultrasound on the proliferation and differentiation of cementoblast lineage cells. *J Periodontol*. 2008 Oct;79(10):1984-90.

Ivanovski S, Li H, Daley T, Bartold PM. An immunohistochemical study of matrix molecules associated with barrier membrane-mediated periodontal wound healing. *J Periodontal Res*. 2000;35(3):115-26.

Ivanovski S, Li H, Haase HR, Bartold PM. Expression of bone associated macromolecules by gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodont Res*. 2001;36(3):131-41.

Jeffcoat MK, Williams RC, Wechter WJ, Johnson HG, Kaplan ML, Gandrup JS, et al. Flurbiprofen treatment of periodontal disease in beagles. *J Periodontal Res.* 1986 Nov;21(6):624-33.

Jeffcoat MK, Reddy MS, Wang IC, Meuninghoff LA, Farmer JB, Koth DL. The effect of systemic flurbiprofen on bone supporting dental implants. *J Am Dent Assoc.* 1995 Mar;126(3):305-11.

Jeffcoat MK, Lewis CE, Reddy MS, Wang CY, Redford M. Post-menopausal bone loss and its relationship to oral bone loss. *Periodontol* 2000. 2000 Jun;23:94-102

Jeffcoat MK, Cizza G, Shih WJ, Genco R, Lombardi A. Efficacy of bisphosphonates for the control of alveolar bone loss in periodontitis. *J Int Acad Periodontol.* 2007 Jul;9(3):70-6.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica.* 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Host-mediated resolution of inflammation in periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2006;40:144-63.

Kaynak D, Meffert R, Günhan M, Günhan O, Ozkaya O. A histopathological investigation on the effects of the bisphosphonate alendronate on resorptive phase following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. *J Periodontol.* 2000 May;71(5):790-6.

Kim YD, Song WW, Kim SS, Kim GC, Hwang DS, Shin SH, et al. Expression of receptor activator of nuclear factor -kappaB ligand, receptor activator of nuclear factor -kappaB, and osteoprotegerin, following low-level laser treatment on deproteinized bovine bone graft in rats. *Lasers Med Sci.* 2009;24(4):577-84.

Kinane DF, Lindhe J. Patogênese da periodontite. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral.* 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

Koide M, Suda S, Saitoh S, Ofuji Y, Suzuki T, Yoshie H, et al. In vivo administration of IL-1 beta accelerates silk ligature-induced alveolar bone resorption in rats. *J Oral Pathol Med*. 1995 Oct;24(9):420-34.

Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol* 2000. 1997 Jun;14:33-53.

Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol*. 2008 Aug;79(8 Suppl):1560-8.

Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2004 Apr;39(2):101-6.

Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Robbins basic pathology. 7. ed. New York: Saunders; 2002.

Kunimatsu K, Matakai S, Tanaka H, Mine N, Kiyoki M, Hosoda K, et al. A cross-sectional study on osteocalcin levels in gingival crevicular fluid from periodontal patients. *J Periodontol*. 1993 Sep;64(9):865-9.

Landesberg R, Eisig S, Fennoy I, Siris E. Alternative indications for bisphosphonate therapy. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009 May;67(5 Suppl):27-34.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33:149-74.

Lane N, Armitage GC, Loomer P, Hsieh S, Majumdar S, Wang HY, et al. Bisphosphonate therapy improves the outcome of conventional periodontal treatment: results of a 12-month, randomized, placebo-controlled study. *J Periodontol*. 2005 Jul;76(7):1113-22.

Lee AJ, Walsh TF, Hodges SJ, Rawlinson A. Gingival crevicular fluid osteocalcin in adult periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1999 Apr;26(4):252-6.

Leibbrandt A, Penninger JM. RANK(L) as a key target for controlling bone loss. *Adv Exp Med Biol.* 2009;647:130-45.

Lekic P, Sodek J, McCulloch CAG. Osteopontin and Bone Sialoprotein Expression in Regenerating Rat Periodontal Ligament and Alveolar Bone. *Anat Rec.* 1996;244(1):50-8.

Levin L, Bryson EC, Caplan D, Trope M. Effect of topical alendronate on root resorption of dried replanted dog teeth. *Dent Traumatol.* 2001 Jun;17(3):120-6.

Lian JB, Gundberg CM. Osteocalcin. Biochemical considerations and clinical applications. *Clin Orthop Relat Res.* 1988 Jan;(226):267-91.

Li CY, Yam LT, Lam KW. Acid phosphatase isoenzyme in human leukocytes in normal and pathologic conditions. *J Histochem Cytochem.* 1970 Jul;18(7):473-81.

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

Lipton A. Emerging role of bisphosphonates in the clinic--antitumor activity and prevention of metastasis to bone. *Cancer Treat Rev.* 2008;34 Suppl 1:S25-30.

Liu L, Igarashi K, Haruyama N, Saeki S, Shinoda H, Mitani H. Effects of local administration of clodronate on orthodontic tooth movement and root resorption in rats. *Eur J Orthod.* 2004 Oct;26(5):469-73.

Llavaneras A, Ramamurthy NS, Heikkilä P, Teronen O, Salo T, Rifkin BR, et al. A combination of a chemically modified doxycycline and a bisphosphonate synergistically inhibits endotoxin-induced periodontal breakdown in rats. *J Periodontol.* 2001 Aug;72(8):1069-77.

Marshall MJ, Holt I, Davie MW. Osteoclast recruitment in mice is stimulated by (3-amino-1-hydroxypropylidene)-1,1-bisphosphonate. *Calcif Tissue Int.* 1993 Jan;52(1):21-5.

Mathov I, Plotkin LI, Sgarlata CL, Leoni J, Bellido T. Extracellular signal-regulated kinases and calcium channels are involved in the proliferative effect of bisphosphonates on osteoblastic cells in vitro. *J Bone Miner Res.* 2001 Nov;16(11):2050-6.

McCauley LK, Nohutcu RM. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. *J Periodontol.* 2002 Nov;73(11):1377-91.

Mehlhorn AT, Rechl H, Gradinger R, Stemberger A. Alendronate decreases TRACP 5b activity in osteoarthritic bone. *Eur J Med Res.* 2008 Jan 23;13(1):21-5.

Menezes AM, Rocha FA, Chaves HV, Carvalho CB, Ribeiro RA, Brito GA. Effect of sodium alendronate on alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2005 Nov;76(11):1901-9.

Meraw EJ, Reeve CM, Wollan PC. Use of alendronate in peri-implant defect regeneration. *J Periodontol.* 1999 Feb;70(2):151-8.

Mitsuta T, Horiuchi H, Shinoda H. Effects of topical administration of clodronate on alveolar bone resorption in rats with experimental periodontitis. *J Periodontol.* 2002 May;73(5):479-86.

Mühlbauer RC, Bauss F, Schenk R, Janner M, Bosies E, Strein K, et al. BM 21.0955, a potent new bisphosphonate to inhibit bone resorption. *J Bone Miner Res.* 1991 Sep;6(9):1003-11.

Naidu A, Dechow PC, Spears R, Wright JM, Kessler HP, Opperman LA. Oral The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro. *Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 Jul;106(1):5-13.

Nair SP, Meghji S, Wilson M, Reddi K, White P, Henderson B. Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infect Immun.* 1996 Jul;64(7):2371-80.

Nakaya H, Osawa G, Iwasaki N, Cochran DL, Kamoi K, Oates TW. Effects of bisphosphonate on matrix metalloproteinase enzymes in human periodontal ligament cells. *J Periodontol*. 2000 Jul;71(7):1158-66.

Nikolopoulos GK, Dimou NL, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease: a meta-analysis of 53 studies including 4178 cases and 4590 controls. *J Clin Periodontol*. 2008 Sep;35(9):754-67.

Nishikawa M, Akatsu T, Katayama Y, Yasutomo Y, Kado S, Kugal N, et al. Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. *Bone*. 1996 Jan;18(1):9-14.

Nobre MD, Fernandes RG, Chin CM, Faig-Leite H. Local action of sodium alendronate in bone repair of spontaneously hypertensive rat (SHR). *Arq Bras Cardiol*. 2008 Apr;90(4):239-46.

Nowotny A, Sanavi F. Induction of nonspecific tolerance to endotoxins reduces the alveolar bone resorption in ligature-treated rats. *Infect Immun*. 1983 Feb;39(2):873-8.

Nuti E, Tuccinardi T, Rossello A. Matrix metalloproteinase inhibitors: new challenges in the era of post broad-spectrum inhibitors. *Curr Pharm Des*. 2007;13(20):2087-100.

Nymam S, Schroeser HE, Lindhe J. Supressio of inflammation and bone resorption by indomethacin during experimental periodontitis in dogs. *J Periodontol*. 1979; 50(9): 450-61.

Offenbacher S, Braswell LD, Loos AS, Johnson HG, Hall CM, McClure H, et al. Effects of flurbiprofen on the progression of periodontitis in *Macaca mulatta*. *J Periodontal Res*. 1987 Nov;22(6):473-81.

Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PGE₂ secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol*. 1993 May;64(5 Suppl):432-44.

Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol*. 1996 Nov;1(1):821-78.

Ohlsson K, Olsson I. The neutral proteases of human granulocytes. Isolation and partial characterization of two granulocyte collagenases. *Eur J Biochem*. 1973 Jul 16;36(2):473-81.

Orriss IR, Key ML, Colston KW, Arnett TR. Inhibition of osteoblast function in vitro by aminobisphosphonates. *J Cell Biochem*. 2009 Jan 1;106(1):109-18.

Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*. 1997 Jun;14:9-11.

Palomo L, Bissada N, Liu J. Bisphosphonate therapy for bone loss in patients with osteoporosis and periodontal disease: clinical perspectives and review of the literature. *Quintessence Int*. 2006 Feb;37(2):103-7.

Papapetrou PD. Bisphosphonate-associated adverse events. *Hormones (Athens)*. 2009 Apr-Jun;8(2):96-110.

Parfitt AM. The two faces of growth: benefits and risks to bone integrity. *Osteoporos Int*. 1994 Nov;4(6):382-98.

Perini TA, Oliveira GL, Ornellas JS, Oliveira FP. Cálculo do erro técnico de medição em antropometria. *Rev Bras Med Esporte* 2005 Jan/Fev;11(1): 81-5.

Peruzzo DC, Benatti BB, Andersen ML, Tufik S, Casati MZ, Nociti FH Jr. Evidence that metyrapone in the presence of inflammation modulates cytokine mRNA expression. *Cytokine*. 2010 Dec;52(3):184-9.

Preshaw PM, Novak MJ, Mellonig J, Magnusson I, Polson A, Giannobile WV, et al. Modified-release subantimicrobial dose doxycycline enhances scaling and root planing in subjects with periodontal disease. *J Periodontol*. 2008 Mar;79(3):440-52.

Quinn R. Comparing rats to human's age: How old is my rat in people years? *Nutrition* 2005; 21: 775-777.

Ramamurthy NS, Rifkin BR, Greenwald RA, Xu JW, Liu Y, Turner G, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-mediated periodontal bone loss in rats: a comparison of 6 chemically modified tetracyclines. *J Periodontol*. 2002 Jul;73(7):726-34.

Raymond MH, Schutte BC, Torner JC, Burns TL, Willing MC. Osteocalcin: genetic and physical mapping of the human gene BGLAP and its potential role in postmenopausal osteoporosis. *Genomics*. 1999 Sep 1;60(2):210-7.

Reddy MS, Weatherford TW, Smith CA, West BD, Jeffcoat MK, Jacks TM. Alendronate treatment of naturally-occurring periodontitis in beagle dogs. *J Periodontol*. 1995 Mar;66(3):211-7.

Reddy MS, Geurs NC, Gunsolley JC. Periodontal host modulation with antiproteinase, anti-inflammatory, and bone-sparing agents. A systematic review. *Ann Periodontol*. 2003 Dec;8(1):12- 37.

Reddy GT, Kumar TM, Veena KM. Formulation and evaluation of Alendronate Sodium gel for the treatment of bone resorptive lesions in Periodontitis. *Drug Deliv*. 2005 Jul-Aug;12(4):217-22.

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 Nov 1;60(21):6001-7.

Rifkin BR, Vernillo AT, Golub LM. Blocking periodontal disease progression by inhibiting tissue-destructive enzymes: a potential therapeutic role for tetracyclines and their chemically-modified analogs. *J Periodontol*. 1993 Aug;64(8 Suppl):819-27.

Rizzoli R, Burlet N, Cahall D, Delmas PD, Eriksen EF, Felsenberg D, et al. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonate treatment for osteoporosis. *Bone*. 2008 May;42(5):841-7.

Rocha M, Nava LE, Vázquez de la Torre C, Sánchez-Márin F, Garay-Sevilla ME, Malacara JM. Clinical and radiological improvement of periodontal disease in patients with type 2 diabetes mellitus treated with alendronate: a randomized, placebo-controlled trial. *J Periodontol*. 2001 Feb;72(2):204-9.

Rocha ML, Malacara JM, Sánchez-Marin FJ, Vazquez de la Torre CJ, Fajardo ME. Effect of alendronate on periodontal disease in postmenopausal women: a randomized placebo-controlled trial. *J Periodontol*. 2004 Dec;75(12):1579-85.

Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res*. 2006 Oct 15;12:6222s-6230s.

Rogers JE, Li F, Coatney D, Rossa Jr C, Bronson J, Krieder JM. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Lipopolysaccharide-Mediated Experimental Bone Loss Model for Aggressive Periodontitis. *J Periodontol*. 2007;78:550-8.

Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer*. 2000 Jun 15;88(12 Suppl):2961-78.

Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004 May;62(5):527-34.

Ruggiero SL, Mehrotra B. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: diagnosis, prevention, and management. *Annu Rev Med*. 2009;60:85-96.

Russell RG, Rogers MJ. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone*. 1999 Jul;25(1):97-106.

Russell RG. Bisphosphonates: Mode of Action and Pharmacology. *Pediatrics* 2007;119;S150-S162.

Russell RG, Xia Z, Dunford JE, Oppermann U, Kwaasi A, Hulley PA, et al. Bisphosphonates: an update on mechanisms of action and how these relate to clinical efficacy. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Nov;1117:209-57.

Salvi GE, Yalda B, Collins JG, Jones BH, Smith FW, Arnold RR, et al. Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal diseases in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Periodontol.* 1997 Feb;68(2):127-35.

Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 2005;32 Suppl 6:108-29.

Schenk R, Egli P, Fleisch H, Rosini S. Quantitative morphometric evaluation of the inhibitory activity of new aminobisphosphonates on bone resorption in the rat. *Calcif Tissue Int.* 1986;38:342-9.

Schroeder HE, Lindhe J. Conversion of stable established gingivitis in the dog into destructive periodontitis. *Arch Oral Biol.* 1975 Dec;20(12):775-82.

Schwartz Z, Kieswetter K, Dean DD, Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone-surface interface during regeneration. *J Periodontal Res.* 1997 Jan;32(1 Pt 2):166-71.

Seibel MJ. Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. *Osteoporos Int.* 2000;11 Suppl 6:S18-29.

Shibata T, Komatsu K, Shimada A, Shimoda S, Oida S, Kawasaki K, et al. Effects of alendronate on restoration of biomechanical properties of periodontium in replanted rat molars. *J Periodontal Res.* 2004 Dec;39(6):405-14.

Shiraki M, Yamazaki Y, Shiraki Y, Hosoi T, Tsugawa N, Okano T. High level of serum undercarboxylated osteocalcin in patients with incident fractures during bisphosphonate treatment. *J Bone Miner Metab.* 2010 Sep;28(5):578-84.

Shoji K, Horiuchi H, Shinoda H. Inhibitory effects of a bisphosphonate (risedronate) on experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 1995 Jul;30(4):277-84.

Silva CMOM. Avaliação do alendronato sódico sobre a reparação óssea na ausência dos hormônios ovarianos [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos: UNESP - Univ Estadual Paulista; 2000.

Silverman SL. Paget disease of bone: therapeutic options. *J Clin Rheumatol.* 2008 Oct;14(5):299-305.

Silvestrini G, Ballanti P, Patacchioli F, Leopizzi M, Gualtieri MLN, Monnazzi P, et al. Detection of osteoprotegerin (OPG) and its ligand (RANKL) mRNA and protein in femur and tibia of the rat. *J Mol Histol.* 2005;36(1-2):59-67.

Sismey-Durrant HJ, Hopps RM. The effect of lipopolysaccharide from the oral bacterium *Bacteroides gingivalis* on osteoclastic resorption of sperm-whale dentine slices in vitro. *Arch Oral Biol.* 1987;32(12):911-3.

Spolidorio LC, Marcantonio E Jr, Spolidorio DM, Nassar CA, Nassar PO, Marcantonio RA, et al. Alendronate therapy in cyclosporine-induced alveolar bone loss in rats. *J Periodontal Res.* 2007 Oct;42(5):466-73.

Spolidorio LC, Herrera BS, Coimbra LS, Spolidorio DM, Muscará MN, Rossa C Jr. Intermittent therapy with 1,25 vitamin D and calcitonin prevents cyclosporin-induced alveolar bone loss in rats. *Calcif Tissue Int.* 2010 Sep;87(3):236-45.

Srisubut S, Teerakapong A, Vattraphodes T, Taweekaisupapong S. Effect of local delivery of alendronate on bone formation in bioactive glass grafting in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007 Oct;104(4):e11-6.

Sugawara S, Shibazaki M, Takada H, Kosugi H, Endo Y. Contrasting effects of an aminobisphosphonate, a potent inhibitor of bone resorption, on lipopolysaccharide-induced production of interleukin-1 and tumour necrosis factor alpha in mice. *Br J Pharmacol*. 1998 Oct;125(4):735-40.

Takagi K, Takagi M, Kanangat S, Warrington KJ, Shigemitsu H, Postlethwaite AE. Modulation of TNF-alpha gene expression by IFN-gamma and pamidronate in murine macrophages: regulation by STAT1-dependent pathways. *J Immunol*. 2005 Feb 15;174(4):1801-10.

Tani-Ishii N, Minamida G, Saitoh D, Chieda K, Omuro H, Sugaya A, et al. Inhibitory effects of incadronate on the progression of rat experimental periodontitis by porphyromonas gingivalis infection. *J Periodontol*. 2003 May;74(5):603-9.

Tenenbaum HC, Shelemay A, Girard B, Zohar R, Fritz PC. Bisphosphonates and periodontics: potential applications for regulation of bone mass in the periodontium and other therapeutic/diagnostic uses. *J Periodontol*. 2002 Jul;73(7):813-22.

Tera TM. Imunolocalização dos marcadores de formação e reabsorção óssea em regeneração óssea guiada em ratas com deficiência estrogênica [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos: UNESP - Univ Estadual Paulista; 2010.

Teronen O, Heikkilä P, Konttinen YT, Laitinen M, Salo T, Hanemaaijer R, et al. MMP inhibition and downregulation by bisphosphonates. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 Jun 30;878:453-65.

Terpos E, Efstathiou E, Christoulas D, Roussou M, Katodritou E, Dimopoulos MA. RANKL inhibition: clinical implications for the management of patients with multiple myeloma and solid tumors with bone metastases. *Expert Opin Biol Ther*. 2009 Apr;9(4):465-79.

Trowbridge OH, Emling CR. Inflamação: uma revisão do processo. 4. ed. São Paulo: Quintessence; 1996.

Umland EM, Boyce EG. Risedronate: a new oral bisphosphonate. *Clin Ther*. 2001 Sep;23(9):1409-21.

Valenti MT, Giannini S, Donatelli L, Zanatta M, Bertoldo F, Sella S, et al. The effect of risedronate on osteogenic lineage is mediated by cyclooxygenase-2 gene upregulation. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(4):R163.

Van Beek ER, Löwik CW, Papapoulos SE. Bisphosphonates suppress bone resorption by a direct effect on early osteoclast precursors without affecting the osteoclastogenic capacity of osteogenic cells: the role of protein geranylgeranylation in the action of nitrogen-containing bisphosphonates on osteoclast precursors. *Bone*. 2002 Jan;30(1):64-70.

Vardar-Sengül S, Buduneli N, Buduneli E, Baylas H, Atilla G, Lappin D, et al. Effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitor and omega-3 fatty acid on serum interleukin-1beta, osteocalcin, and C-reactive protein levels in rats. *J Periodontol*. 2006 Apr;77(4):657-63.

Vasconcellos DV, Duarte ME, Maia RC. Efeito Anti-Tumoral dos Bisfosfonatos: uma Nova Perspectiva Terapêutica. *Rev Bras de Cancerol*. 2004;50(1):45-54.

Vasikaran SD. Utility of biochemical markers of bone turnover and bone mineral density in management of osteoporosis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2008;45(2):221-58.

Viereck V, Emons G, Lauck V, Frosch KH, Blaschke S, Gründker C, et al. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Mar 1;291(3):680-6.

Wang CZ, Chen SM, Chen CH, Wang CK, Wang GJ, Chang JK, et al. The effect of the local delivery of alendronate on human adipose-derived stem cell-based bone regeneration. *Biomaterials*. 2010 Nov;31(33):8674-83.

Weeks-Dybvig M, Sanavi F, Zander H, Rifkin BR. The effect of indomethacin on alveolar bone loss in experimental periodontitis. *J Periodontal Res*. 1982 Jan;17(1):90-100.

Weinreb M, Quartuccio H, Seedor JG, Aufdemorte TB, Brunsvold M, Chaves E, et al. Histomorphometrical analysis of the effects of the bisphosphonate alendronate on bone loss caused by experimental periodontitis in monkeys. *J Periodontal Res.* 1994 Jan;29(1):35-40.

Weinstein RS, Roberson PK, Manolagas SC. Giant osteoclast formation and long-term oral bisphosphonate therapy. *N Engl J Med.* 2009 Jan 1;360(1):53-62.

Williams RC, Jeffcoat MK, Howell TH, Reddy MS, Johnson HG, Hall CM, et al. Ibuprofen: an inhibitor of alveolar bone resorption in beagles. *J Periodontal Res.* 1988 Jul;23(4):225-9.

Wu HF, Xu J, Ang ES, Yip K, Woloszyn M, Zheng MH, et al. NF-kappaB modulators in osteolytic bone diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009 Feb;20(1):7-17.

Xiong H, Wei L, Hu Y, Zhang C, Peng B. Effect of alendronate on alveolar bone resorption and angiogenesis in rats with experimental periapical lesions. *Int Endod J.* 2010 Jun;43(6):485-91.

Yaffe A, Fine N, Alt I, Binderman I. The effect of bisphosphonate on alveolar bone resorption following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. *J Periodontol.* 1995 Nov;66(11):999-1003.

Yaffe A, Iztzovich M, Earon Y, Alt I, Lilov R, Binderman I. Local delivery of an amino bisphosphonate prevents the resorptive phase of alveolar bone following mucoperiosteal flap surgery in rats. *J Periodontol.* 1997 Sep;68(9):884-9.

Yaffe A, Golomb G, Breuer E, Binderman I. The effect of topical delivery of novel bisacylphosphonates in reducing alveolar bone loss in the rat model. *J Periodontol.* 2000 Oct;71(10):1607-12.

Yu Z, Ramamurthy NS, Leung M, Chang KM, McNamara TF, Golub LM. Chemically-modified tetracycline normalizes collagen metabolism in diabetic rats: a dose-response study. *J Periodontal Res.* 1993 Nov; 28:420-8.

Zhao H, Shuto T, Hirata G, Iwamoto Y. Aminobisphosphonate (YM175) inhibits bone destruction in rat adjuvant arthritis. *J Orthop Sci.* 2000;5(4):397-403.

Zhou Q, Zhao ZN, Cheng JT, Zhang B, Xu J, Huang F, et al. Ibandronate promotes osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells by regulating the expression of microRNAs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Jan 7;404(1):127-32.

APÊNDICE A – Dados originais, tabelas de estatística inferencial do parâmetro VtF

Tabela 6 - Dados originais do VtF (%)

C1	C2	A1	A2	R1	R2	R3	R4	R5	R6
68,54	60,21	8,13	5,43	27,50	10,21	11,71	32,71	28,13	13,54
67,92	56,88	1,88	5,63	23,13	15,63	13,13	18,33	15,21	8,12
58,75	59,17	1,46	0,63	25,63	26,88	1,67	31,04	1,25	3,12
58,33	65,00	1,67	10,21	36,46	22,71	11,46	42,08	17,29	18,75
60,42	67,08	2,71	4,79	31,04	22,29	15,83	26,25	29,17	16,04
61,51	64,03	6,95	0,84	27,65	9,79	11,68	23,90	25,83	8,33

Tabela 7 - Resultado do teste de comparação Dunnet no grupo GD para o parâmetro VtF em relação ao controle sem doença (C1)

Grupos	Médias (%)	Diferenças (%)	t	p
C1	62,00			
A1	3,16	-58,833	-20,38	0,00001*
R1	28,17	-33,833	-11,79	0,00001*
R2	17,33	-44,667	-17,91	0,00001*
R3	10,33	-51,667	-20,38	0,00001*

*p<0,05

Tabela 8 - Resultado do teste de comparação Dunnet no grupo GD para o parâmetro VtF em relação ao placebo (A1)

Grupos	Médias (%)	Diferenças (%)	t	p
A1	3,16			
R1	28,17	25,000	8,588	0,00001*
R2	17,33	14,167	4,895	0,0002*
R3	10,33	7,167	2,466	0,0474*

*p<0,05

Tabela 9 - Resultado do teste de comparação Dunnet no grupo GU para o parâmetro VtF em relação ao controle sem doença (C2)

Grupos	Médias (%)	Diferenças (%)	t	p
C2	61,833			
A2	4,000	-48,641	-14,31	0,00001*
R4	28,667	-33,167	-8,22	0,00001*
R5	19,167	-33,475	-10,61	0,00001*
R6	11,000	-41,641	-12,64	0,00001*

*p<0,05

Tabela 10 - Resultado do teste de comparação Dunnet no grupo GU para o parâmetro VtF em relação ao placebo (A2)

Grupos	Médias (%)	Diferenças (%)	t	p
A2	4,000			
R4	28,667	24,667	6,093	0,00001*
R5	19,167	15,167	3,709	0,0038*
R6	11,000	7,000	1,677	0,2957

*p<0,05

Tabela 11 - Resultado do teste ANOVA para o parâmetro VtF em relação aos grupos tratados com risendronato (R1 a R6)

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	p
Dosagem	2	1903,72	951,861	18,52	0,0001*
Aplicações	1	9,00	9,000	0,18	0,6786
Interação	2	3,17	1,583	0,03	0,9697
Resíduo	30	1541,67	51,389		
Total	35	3457,56			

*p<0,05

Tabela 12 - Formação de grupos de mesmo desempenho, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%)

Grupos	Dosagem (mg)	Aplicações	Médias (%)	Grupos Homogêneos*
R1	0,125	2		A
R2	0,25	2		B
R3	0,5	2		C
R4	0,125	1		A
R5	0,25	1		B
R6	0,5	1		C

* médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

APÊNDICE B – Dados originais, tabelas de estatística inferencial do parâmetro VtC

Tabela 13 - Dados originais do VtC (%)

C1	C2	A1	A2	R1	R2	R3	R4	R5	R6
83,33	86,04	61,75	57,50	64,75	62,29	61,75	70,41	68,95	71,75
82,00	80,00	48,75	59,18	61,67	62,50	73,75	68,00	73,54	69,50
85,63	78,96	49,375	48,75	69,25	66,50	80,25	76,45	69,50	71,25
81,75	82,29	53,54	60,21	79,17	73,58	67,92	70,20	69,25	68,75
84,00	84,50	55,40	57,19	65,83	68,95	67,50	66,81	69,50	63,50
79,08	81,23	57,65	48,05	74,70	68,33	70,63	68,47	73,54	72,35

Tabela 14 - Resultado do teste de comparação Dunnet no grupo GD para o parâmetro VtC em relação ao controle sem doença (C1)

Grupos	Médias (%)	Diferenças (%)	t	p
C1	82,333			
A1	53,833	-28,500	-9,546	0,00001*
R1	68,667	-13,667	-4,534	0,0005*
R2	66,500	-15,833	-5,278	0,0001*
R3	69,667	-12,667	-4,171	0,0012*

*p<0,05

Tabela 15 - Resultado do teste de comparação Dunnet no grupo GD para o parâmetro VtC em relação ao placebo (A1)

Grupos	Médias (%)	Diferenças (%)	t	p
A1	53,833			
R1	68,667	14,833	5,012	0,0001*
R2	66,500	12,667	4,268	0,0009*
R3	69,667	15,833	5,375	0,0001*

*p<0,05

Tabela 16 - Resultado do teste de comparação Dunnet no grupo GU para o parâmetro VtC em relação ao controle sem doença (C2)

Grupos	Médias (%)	Diferenças (%)	t	p
C2	81,833			
A2	54,833	-27,000	-13,19	0,00001*
R4	69,667	-12,167	-5,91	0,00001*
R5	70,167	-11,667	-5,59	0,00001*
R6	69,000	-12,833	-6,18	0,00001*

*p<0,05

Tabela 17 - Resultado do teste de comparação Dunnet no grupo GU para o parâmetro VtC em relação ao placebo (A2)

Grupos	Médias (%)	Diferenças (%)	t	p
A2	54,833			
R4	69,667	14,833	7,283	0,00001*
R5	70,167	15,333	7,602	0,00001*
R6	69,000	14,167	7,017	0,00001*

*p<0,05

Tabela 18 - Resultado do teste ANOVA para o parâmetro VtC em relação ao grupos tratados com risendronato (R1 a R6)

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	p
Dosagem	2	6,889	3,4444	0,16	0,8562
Aplicações	1	16,000	16,000	0,72	0,4013
Interação	2	28,667	14,333	0,65	0,5296
Resíduo	30	662,333	22,0778		
Total	35	713,889			

*p<0,05

Tabela 19 - Formação de grupos de mesmo desempenho, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) para o VtC

Grupo	Dosagem (mg)	Aplicações	Médias (%)	Grupos Homogêneos*
R1	0,125	2	68,667	A
R2	0,25	2	66,500	A
R3	0,5	2	69,667	A
R4	0,125	1	69,667	A
R5	0,25	1	70,167	A
R6	0,5	1	69,000	A

* médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

APÊNDICE C – Dados originais, tabelas de estatística inferencial do parâmetro DL

Tabela 20 - Dados originais do parâmetro DL (μm)

C1	C2	A1	A2	R1	R2	R3	R4	R5	R6
867,71	813,33	88,36	90,75	466,77	777,96	567,11	326,72	582,99	655,37
1192,88	1314,13	93,13	81,79	459,35	640,30	619,75	666,42	659,00	946,87
1153,53	804,48	129,85	119,40	421,14	468,76	974,53	463,13	800,64	1096,52
1301,19	1033,03	83,28	95,22	384,28	537,26	735,22	246,52	566,07	634,18
1400,31	1576,40	93,73	97,91	375,22	552,14	626,32	366,31	546,27	981,69
1212,61	1525,72	103,46	105,97	410,79	772,69	962,69	496,63	482,69	649,25

Tabela 21 - Resultado do teste de comparação Dunnet no grupo GD para o parâmetro DL em relação ao controle sem doença (C1)

Grupos	Médias (%)	Diferenças (%)	t	p
C1	98,2			
A1	1187,5	1089,3	14,642	0,00001*
R1	419,2	321,0	4,314	0,0008*
R2	624,3	526,2	7,072	0,00001*
R3	747,2	649,0	8,722	0,00001*

*p<0,05

Tabela 22 - Resultado do teste de comparação Dunnet no grupo GD para o parâmetro DL em relação ao placebo (A1)

Grupos	Médias (%)	Diferenças (%)	t	p
A1	1187,5			
R1	419,2	-768,3	-10,33	0,00001*
R2	624,3	-563,2	-7,57	0,00001*
R3	747,2	-440,3	-5,92	0,00001*

*p<0,05

Tabela 23 - Resultado do teste de comparação Dunnet no grupo GU para o parâmetro DL em relação ao controle sem doença (C2)

Grupos	Médias (%)	Diferenças (%)	t	p
C2	97,8			
A2	1177,5	1079,7	9,476	0,00001*
R4	427,2	329,3	2,889	0,0267*
R5	605,8	508,0	4,458	0,0006*
R6	826,8	1079,7	6,398	0,00001*

*p<0,05

Tabela 24 - Resultado do teste de comparação Dunnet no grupo GU para o parâmetro DL em relação ao placebo (A2)

Grupos	Médias (%)	Diferenças (%)	t	p
A2	1177,5			
R4	427,2	-750,3	-6,586	0,00001*
R5	605,8	-571,7	-5,018	0,0001*
R6	826,8	-350,7	-3,077	0,0173*

*p<0,05

Tabela 25 - Resultado do teste ANOVA para o parâmetro DL em relação ao grupos tratados com risendronato (R1 a R6)

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	p
Dosagem	2	795048	397524	18,89	0,00001*
Aplicações	1	4784	4784	0,23	0,6369
Interação	2	15475	7738	0,37	0,6954
Resíduo	30	631248	21042		
Total	35	1446555			

*p<0,05

Tabela 26 - Formação de grupos de mesmo desempenho, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) para o parâmetro DL

Grupo	Dosagem (mg)	Aplicações	Médias (μ m)	Grupos Homogêneos*
R1	0,125	2	419,2	A
R2	0,25	2	624,3	B
R3	0,5	2	747,2	C
R4	0,125	1	427,2	A
R5	0,25	1	605,8	B
R6	0,5	1	826,8	C

* médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

APÊNDICE D – Dados originais, tabelas de estatística inferencial referentes ao TRAP

Tabela 27 - Dados originais do TRAP (número de células positivas)

C1	C2	A1	A2	R1	R2	R3	R4	R5	R6
15	7	16	16	24	13	30	46	44	27
16	6	18	43	18	42	12	15	34	17
9	10	22	26	15	18	26	14	8	18
12	12	26	33	4	14	21	14	25	28
6	15	34	10	16	20	21	42	25	29
5	8	29	26	14	17	24	11	34	21

Tabela 28 - Resultado do teste de comparação Dunnet no grupo GD para o TRAP em relação ao controle sem doença (C1)

Grupos	Médias (%)	Diferenças (%)	t	p
C1	10,500			
A1	15,167	13,667	3,263	0,0112*
R1	20,667	4,667	1,114	0,6364
R2	22,333	10,167	2,427	0,0532
R3	24,167	11,833	2,825	0,0509

*p<0,05; n: número de células positivas

Tabela 29 - Resultado do teste de comparação Dunnet no grupo GD para o parâmetro DL em relação ao placebo (A1)

Grupos	Médias (%)	Diferenças (%)	t	p
A1	15,167			
R1	20,667	-10,500	-2,149	0,0279*
R2	22,333	-3,500	-0,836	0,8186
R3	24,167	-1,833	-0,438	0,9771

*p<0,05; n: número de células positivas

Tabela 30 - Resultado do teste de comparação Dunnet no grupo GU para o parâmetro TRAP em relação ao controle sem doença (C2)

Grupos	Médias (%)	Diferenças (%)	t	p
C2	9,667			
A2	25,667	16,000	2,575	0,0435*
R4	23,667	14,000	2,254	0,1042
R5	28,333	18,667	3,005	0,0205*
R6	23,333	16,000	2,200	0,1158

*p<0,05; n: número de células positivas

Tabela 31 - Resultado do teste de comparação Dunnet no grupo GU para o parâmetro TRAP em relação ao placebo (A2)

Grupos	Médias (%)	Diferenças (%)	t	p
A2	25,667			
R4	23,667	13,076	-0,322	0,9926
R5	28,333	17,743	0,429	0,9786
R6	23,333	12,743	-0,376	0,9868

*p<0,05; n: número de células positivas

Tabela 32 - Resultado do teste ANOVA para o o parâmetro TRAP em relação ao grupos tratados com risendronato (R1 a R6)

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	p
Dosagem	2	203,56	101,778	1,00	0,3781
Aplicações	1	336,11	336,111	3,32	0,0785
Interação	2	123,56	61,778	0,61	0,5500
Resíduo	30	3038,67	101,289		
Total	35	3701,89			

*p<0,05

Tabela 33 - Formação de grupos de mesmo desempenho, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) para o parâmetro DL

Grupo	Dosagem (mg)	Aplicações	Médias (n)	Grupos Homogêneos*
R1	0,125	2	20,667	A
R2	0,25	2	22,333	A
R3	0,5	2	24,167	A
R4	0,125	1	23,667	A
R5	0,25	1	28,333	A
R6	0,5	1	23,333	A

* médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente; n:-número de células positivas.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
R. Eng. Francisco José Emery, 777 - São Dimas - CEP 12251-070 - Fone (11) 344-5000 - Fax (11) 344-7408 -

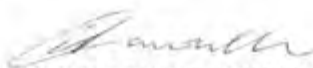
 **Comitê de Ética em Pesquisa**
Envolvendo Animais

São José dos Campos, 16 de maio de 2011

Ofício nº 011/10-CEP

Prezado(a) Sr.(a)	HORÁCIO FAIG LEITE
Projeto	Estudo da ação local do risendronato de sódio na periodontite experimental em ratas normais e hipertensas(SHR)
PARECER	
Por solicitação do Pesquisador e do seu orientado FERNANDO AUGUSTO PERRELLA, foi alterado o título do Projeto acima mencionado, para " Estudo da ação local do risendronato de sódio na periodontite experimental induzida em ratas." - Convalidando dessa forma o Protocolo nº 008/2009-PA/CEP de 11/03/2009.	

Atenciosamente,



Profa. Titular YASMIN RODARTE CARVALHO
Coordenadora

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Jd. São Elismar
CEP: 12201-970 F. (12) 3947-9028 / 9037
Fax: (12) 3947-9010 / mgott@foc.unesp.br / Coorden@foc.unesp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 08/2009-PA/CEP, sobre
"Estudo da ação local do resindronato de sódio na periodontite
experimental em ratas normais e hipertensas (SHR)" sob
responsabilidade de HORÁCIO FAIG LEITE, está de acordo com os
Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio
Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo
Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 11 de março de 2009

Profa. Dra. ADRIANA AIGOTTI HABERBECK BRANDÃO
Coordenadora