



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

THAMIRES PRISCILA CAVAZANA

**Efeito do ácido zoledrônico sobre o reparo dos
tecidos moles sobrejacentes ao sítio de extração
dental: estudo envolvendo os principais fatores de
risco para o desenvolvimento de osteonecrose dos
maxilares**

**Araçatuba – SP
2015**



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

THAMIRES PRISCILA CAVAZANA

Efeito do ácido zoledrônico sobre o reparo dos tecidos moles sobrejacentes ao sítio de extração dental: estudo envolvendo os principais fatores de risco para o desenvolvimento de osteonecrose dos maxilares

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

Orientador: Prof. Dr. Edilson Ervolino

**Araçatuba – SP
2015**

A minha família, com amor e gratidão, por toda a dedicação, empenho, paciência e carinho que recebi durante toda minha formação e realização do presente trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que até aqui tem me sustentado, sendo minha fonte inesgotável de força, sabedoria e esperança.

Ao Professor Edilson Ervolino que, nos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual, nunca medindo esforços para melhorar minha formação.

Aos amigos de laboratório que, em todos os momentos, ajudaram no desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos que a faculdade me proporcionou, por todo companheirismo e apoio tanto em momentos bons como em horas difíceis.

Aos meus familiares e amigos de Araçatuba, por toda a força e incentivo na minha formação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de iniciação científica (*PROCESSO FAPESP Nº 2013/25367-4*) e pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa (*PROCESSO FAPESP Nº 2013/26779-4*).

“O Código do Debate de Ideias é o alicerce do processo de formação de pensadores, o segredo que fundamenta intelectos livres, destemidos, intrépidos, seguros, participativos. Ó o Código que habilita a trabalhar em equipe, interagir, trocar experiências, romper o cerco da insegurança”.

Augusto Cury

CAVAZANA, T.P. Efeito do ácido zoledrônico sobre o reparo dos tecidos moles sobrejacentes ao sítio de extração dental: estudo envolvendo os principais fatores de risco para o desenvolvimento de osteonecrose dos maxilares. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

RESUMO

Os bisfosfonatos (BPs) consistem em uma linha de fármacos utilizados no tratamento de algumas osteopatias ou neoplasias malignas osteotrópicas. Os BPs exercem potente ação inibitória sobre o processo de reabsorção óssea. Um dos seus efeitos adversos é a ocorrência da osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (ONM-M). Dentre os fatores de risco para o desencadeamento da ONM-M (BPs) estão: uso crônico de BPs nitrogenados, especialmente o ácido zoledrônico, via de administração intravenosa, gênero feminino, idade avançada e intervenções cirúrgicas odontológicas, em especial exodontias. A etiopatogenia da doença é pobremente compreendida, o que dificulta sua prevenção e tratamento. Alguns estudos in vitro apontam para uma ação efetiva dos BPs sobre células dos tecidos moles, especialmente aqueles situados na sobrejacência dos sítios de extração dental. A ação dos BPs sobre tais células necessita de mais investigação, pois poderia auxiliar na elucidação da etiopatogenia da ONM-M (BPs) e na proposição de tratamentos. O objetivo do presente projeto de pesquisa foi avaliar in vivo o efeito da terapia crônica com o ácido zoledrônico sobre o processo de reparo dos tecidos moles sobrejacentes ao sítio de extração dental em ratas que apresentam os principais fatores de risco para o desenvolvimento de ONM-M. Quatorze ratas (20 meses de idade) foram divididas em dois grupos experimentais, SAL e ZOL, os quais foram submetidos a um plano de tratamento medicamentoso durante 7 semanas. No grupo SAL foi administrado, pela via intraperitoneal, 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9%. No grupo ZOL foi administrado, pela via intraperitoneal, 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% acrescida de 100 µg/Kg de ácido zoledrônico. O intervalo entre as aplicações de ácido zoledrônico ou veículo foi de dois dias. Decorridas três semanas de tratamento todas as ratas foram submetidas à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. Os animais foram submetidos à eutanásia 28 dias pós-operatórios. Foi executado o processamento histológico das hemi-mandíbulas e

os cortes histológicos foram submetidos à coloração pela hematoxilina-eosina ou vermelho picro-sirius, ou ao processamento imunoistoquímico para detecção do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Na mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental foram efetuadas: análise histopatológica, análise histométrica da área ocupada por tecido epitelial (ATE) e da área ocupada por tecido conjuntivo (ATC), análise histoquímica do nível de maturação das fibras colágenas e, quantificação das células PCNA-positivas. ZOL apresentou comprometimento severo no processo de reparação do tecido epitelial e do tecido conjuntivo. ATE, ATC e a porcentagem de fibras colágenas maduras foi menor em ZOL. A quantidade de células PCNA-positivas foi menor tanto no tecido epitelial quanto no tecido conjuntivo em ZOL. Conclui-se que ácido zoledrônico é capaz de comprometer significativamente o processo de reparo dos tecidos moles sobrejacentes ao sítio de extração dental e este efeito negativo do medicamento sobre tais tecidos colabora para o desencadeamento da ONM-M (BPs).

Palavras-chave: Osteonecrose. Maxilares. Ácido zoledrônico. Tecido epitelial. Tecido conjuntivo. Reparação tecidual.

CAVAZANA, T.P. **Zoledronic acid effect on the repair of soft tissue overlying the tooth extraction site: study of the main risk factors for the development of osteonecrosis of the jaws.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

ABSTRACT

Bisphosphonates (BPs) consists of a drug's range used in the treatment of osteopathy or osteotropic malignancies. The BPs exert potent inhibitory effect on bone resorption. One of its side effects is the occurrence of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). Among the risk factors for the onset of MRONJ (BPs) are: chronic use of nitrogen BPs, especially the zoledronic acid, by intravenous route of administration, feminine gender, advanced age and dental surgical procedures, particularly tooth extractions. The pathogenesis of the disease is poorly understood, making it difficult to prevent and treat. Some in vitro studies point to an effective action of BPs on cells of soft tissues, especially those in overlying of dental extraction sites. The BPs actions on such cells needs further investigation because it could help to elucidate the pathogenesis of MRONJ (BPs) and treatments propositions. The objective of this research project was to evaluate in vivo the effect of chronic treatment with zoledronic acid on the repair process of the overlying soft tissues to dental extraction site in rats that present the major risk factors for the development of MRONJ. Fourteen rats (20 months old) were divided into two groups, SAL and ZOL, which underwent a drug treatment plan for 7 weeks. In the SAL group it was administered intraperitoneally, 0.45 ml of 0.9% sodium chloride solution. In ZOL group it was administered intraperitoneally, 0.45 ml of 0.9% sodium chloride solution plus 100 ug / kg zoledronic acid. The interval between the zoledronate applications, or vehicle was two days. After three weeks of treatment all rats were subjected to extraction of the left mandibular first molar. The animals were sacrificed 28 days after surgery. It was performed histological processing of hemi-mandibles and histological sections were stained with hematoxylin-eosin or red picro-sirius, or immunohistochemical processing for detection of proliferation cell nuclear antigen (PCNA). The overlying mucosa to dental extraction site have been made: histopathology, histometric analysis of the area occupied by epithelial tissue (AET) and the area occupied by connective tissue (ACT), immunohistochemical analysis of the maturation level of collagen fibers and quantification of cells PCNA-positive. ZOL

showed severe impairment in the repair process of epithelial tissue and connective tissue. AET, ACT and the percentage of mature collagen fibers was lower in ZOL. The number of PCNA-positive cells was lower in the epithelial tissue and connective tissue ZOL. It follows that zoledronic acid can significantly compromise the healing process of overlying soft tissue to dental extraction site and this negative effect of the drug on such fabrics contributes to the onset of MRONJ (BPs).

Keywords: Osteonecrosis. Jaws. Zoledronic acid. Epithelial tissue. Connective tissue. Tissue repair.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fotografias evidenciando o aspecto clínico do primeiro molar inferior esquerdo durante a instalação da ligadura ao redor do dente (A) e após três semanas de sua manutenção em posição peridental (B). 34
- Figura 2 - Fotografias evidenciando o aspecto clínico do primeiro molar inferior esquerdo durante a instalação da ligadura ao redor do dente (A) e após três semanas de sua manutenção em posição peridental (B). 34
- Figura 3 - Fluxograma evidenciando o delineamento experimental do estudo. 34
- Figura 4 - Gráfico apresentando a evolução do peso corporal das ratas ao longo do período experimental em SAL (traçado cinza) e ZOL (traçado azul). 35
- Figura 5 - Aspecto histológico e histométrico dos tecidos moles sobrejacentes ao sítio de extração dental. (A-B) Gráficos apresentando a área ocupada por tecido epitelial (ATE) e a área ocupada por tecido conjuntivo (ATC). (C-F) Fotomicrografias mostrando o aspecto histológico do tecido epitelial e do tecido conjuntivo em SAL (C-E) e ZOL (D-F) aos 28 dias pós-operatórios. Em ZOL observar a ausência de restituição completa do tecido epitelial e persistência de inflamação na lâmina própria. Abreviações e símbolos: asterisco, $p < 0,05$, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL; tc, tecido conjuntivo; te, tecido epitelial; to, tecido ósseo. Coloração: hematoxilina e eosina. Aumento original: 400x. Barras de escala: 75 μm . 35

Figura 6 - Padrão de maturação das fibras colágenas na lâmina própria da 36
mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental aos 28 dias
pós-operatórios. (A-B) Gráficos apresentando a porcentagem
de fibras colágenas imaturas (A) e fibras colágenas maduras (B)
em SAL e ZOL. (C-D) Fotomicrografias evidenciando o nível de
maturação das fibras colágenas no tecido conjuntivo
sobrejacente ao sítio de extração dental em SAL (C) e ZOL (D)
aos 28 dias pós-operatórios. Abreviações e símbolos: asterisco,
 $p < 0,05$, diferença estatisticamente significativa em relação ao
SAL; tc, tecido conjuntivo. Coloração: vermelho picro sirius em
microscopia de luz polarizada. Aumento original: 250x. Barras
de escala: 100 μm .

Figura 7 - Imunomarcção para PCNA nos tecidos moles da mucosa 36
sobrejacentes ao sítio de extração dental aos 28 dias pós-
operatórios. (A-B) Gráficos apresentando a quantidade de
células PCNA-positivas no tecido epitelial (A) e no tecido
conjuntivo (B) em SAL e ZOL. (C-F) Fotomicrografias
evidenciando o padrão de imunomarcção para PCNA no tecido
epitelial (C e E) e no tecido conjuntivo (D e F) em SAL (C-D) e
ZOL (E-F) aos 28 dias pós-operatórios. Abreviações e símbolos:
asterisco, $p < 0,05$, diferença estatisticamente significativa em
relação ao SAL; setas, células PCNA-positivas; tc, tecido
conjuntivo; te, tecido epitelial. Contra-coloração: *fast green*.
Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 μm .

LISTA DE ABREVIATURAS

%= porcentagem

±= mais ou menos

°C= grau Celsius

<= menor

°GL= grau GL (Gay Lussac)

µm = micrômetro

AAOMS = Associação Americana de Cirurgia Oral e Maxilofacial

ACT= area occupied by connective tissue

AET= area occupied by epithelial tissue

ATC= área ocupada por tecido conjuntivo

ATE= área ocupada por tecido epitelial

BPs= bisfosfonatos

CONCEA= Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

EDTA= ácido etilenodiamino tetra-acético

FOA – UNESP= Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista

M= molar

mg/Kg= miligramas por quilogramas

mL = mililitro

mm= milímetro

mm² = milímetro ao quadrado

MRONJ= medication-related osteonecrosis of the jaw

Nº= número

ONM-M = osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa

PBS= tampão fosfato salino

PCNA = antígeno nuclear de proliferação celular

PE= periodontite experimental

tc = tecido conjuntivo

te = tecido epitelial

to = tecido ósseo

x = vezes

µg/Kg = micrograma por quilograma

SUMÁRIO

1. Introdução	13
2. Objetivo	18
3. Metodologia	19
4. Resultados	24
5. Discussão	27
6. Conclusão	32
Figuras	33
Referências	37
Anexos	43

1. Introdução

Os bisfosfonatos (BPs) consistem em uma linha de fármacos utilizados para o tratamento de osteopatias como osteoporose, doença de Paget, osteogênese imperfeita, mieloma múltiplo ou para controle da progressão de metástase óssea, hipercalcemia e dor óssea em neoplasias malignas osteotrópicas, tais como tumores de mama, próstata, pulmão e rim (DRAKE et al., 2008).

Uma estrutura química análoga ao pirofosfato, representada por dois grupamentos fosfatos ligados covalentemente a um carbono central (P-C-P), caracteriza esta classe de fármacos com potente ação inibitória sobre o processo de reabsorção óssea (ROGERS et al., 2011). No carbono central ainda estão ligadas duas cadeias laterais, R1, que medeia a afinidade pelos cristais de hidroxiapatita e, R2, responsável pela potência e pelas principais propriedades farmacológicas de cada BP (ROGERS et al., 2011). Há duas classes de BPs, cuja estrutura química difere por apresentarem ou não nitrogênio em sua cadeia lateral R2 (ROGERS et al., 2011). A presença ou ausência de nitrogênio resulta em significativas alterações em seus mecanismos de ação (EBETINO et al., 2011). Ácido etidrônico, ácido clodrônico e ácido tiludrônico são BPs que não contêm nitrogênio. Os BPs que contêm nitrogênio são mais potentes, por esta razão mais utilizados atualmente. Seguindo a ordem crescente de potência, são eles: ácido pamidrônico, ácido neridrônico, ácido olpadrônico, ácido alendrônico, ácido ibandrônico, ácido risedrônico e ácido zoledrônico.

Os BPs que contêm nitrogênio alteram o metabolismo ósseo atuando pela inibição da via do mevalonato, através de sua interação e consequente inativação da enzima farnesil difosfato sintase (DUNFORD et al., 2001). A interrupção desta via ao nível da referida enzima impede a formação de farnesil difosfato e geranilgeranil difosfato, os quais são essenciais para prenilação de proteínas, dentre as quais estão Ras, Rho e Rac (LUCKMAN et al., 1998), que atualmente são tidas como os alvos do efeito dessa classe de BPs. Tais proteínas estão relacionadas com a inibição da osteoclastogênese (ABE et al., 2012), com a indução de apoptose prematura em osteoclastos ativos e especialmente com significativas alterações na dinâmica do citoesqueleto, as quais comprometem a interação da célula com a matriz óssea, impedindo a formação do microambiente que propicia o início do processo de reabsorção óssea (COXON & ROGERS, 2003; EBETINO et al., 2011; ORY et al., 2008; ROGERS et al., 2011).

O uso de drogas com potente atividade anti-reabsortiva, como os BPs e os inibidores de RANKL (denosumab), assim como medicamentos com forte ação anti-angiogênica, podem desencadear uma grave reação adversa, a osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (ONM-M). Essa condição tem sido observada cada vez com maior frequência em função da crescente utilização dessas drogas, especialmente os BPs, que dentre eles, são os mais populares (RUSSELL, 2011). A Associação Americana de Cirurgia Oral e Maxilofacial (AAOMS, American Association of Oral and Maxillofacial Surgery) define a ONM-M como presença de osso exposto na região maxilofacial, por um período maior que oito semanas, em pacientes submetidos à tratamento prévio ou atual com droga antireabsortiva ou anti-angiogênica e que não possui história prévia de radioterapia nos maxilares (RUGGIERO et al., 2014).

Ruggiero et al. (2014) classificaram a ONM-M (BPs) da seguinte maneira: estágio I: osso necrótico exposto com ausência de dor ou sinais de infecção (assintomático); estágio II: osso necrótico exposto com presença de dor ou sinais de infecção (sintomático); estágio III: osso necrótico exposto com presença de dor e/ou sinais de infecção juntamente com um ou mais dos seguintes sinais: fratura patológica, fístula oro-cutânea, envolvimento do seio maxilar ou extensão da necrose para a borda inferior ou ramo da mandíbula.

A ONM-M (BPs) é uma condição bastante rara em pacientes que fazem uso de BPs administrados por via oral, como é o caso do ácido alendrônico na dose prescrita para tratamento da osteoporose. No entanto, em paciente que fazem uso de BPs pela via intravenosa, como é o caso do ácido zoledrônico ou sua associação com outros BPs, prescritos para complementação da terapia oncológica, a incidência da ONM-M (BPs) atinge de 1 a 12% dos pacientes, e como os BPs tem efeito cumulativo esta incidência pode atingir 21% dos pacientes após o terceiro ano de uso deste tipo de fármaco (GOMEZ FONT et al., 2008).

Otto et al. (2011), em um minucioso estudo epidemiológico, reportaram que a ONM-M (BPs) acomete com maior frequência o gênero feminino (73%), com idade avançada (em média 66 anos e uma variação entre 42-90 anos de idade), que fazem ou fizeram uso crônico de BPs administrado por via intravenosa (96,8%), especificamente o ácido zoledrônico (47,6%) ou este em associação com outros BPs (24,6%). Há uma predileção pela ocorrência na mandíbula, especificamente na região dos pré-molares e molares (70,6%) e a extração dentária (63,6%) é tida como um dos

principais fatores desencadeadores da ONM-M (BPs) (OTTO et al., 2011). Recentemente, estudos clínicos e experimentais tem atentado para o fato de que a exodontia de dentes com comprometimento periodontal e/ou periapical é o grande fator de risco local, ou seja, a presença prévia de inflamação/infeção local exercem um papel crucial no desencadeamento da ONM-M (BPs) pós exodontia (RUGGIERO & DODSON, 2014; KANG et al., 2013; AGUIRRE et al., 2012; MAWARDI et al., 2009). Ainda que as primeiras descrições de ONM-M (BPs) tenham sido publicadas em 2003 sua etiopatogenia é pobremente compreendida. Como a investigação dos fatores etiopatológicos apresenta limitações em estudos executados em humanos, atualmente os modelos experimentais em animais têm direcionado as pesquisas científicas, no entanto, em função de tais modelos e protocolos medicamentosos serem muito diversificados, os resultados se mostram escassos, incongruentes e muitas vezes contraditórios. Dentre os supostos fatores etiopatológicos que atualmente são apontados como os desencadeadores da ONM-M (BPs) estão: a potente supressão da atividade reabsortiva dos osteoclastos, o que resulta no acúmulo de microfraturas no tecido ósseo e consequentemente áreas de tecido ósseo não vital, o que seria capaz de favorecer o estabelecimento de necrose; o potente efeito antiangiogênico dos BPs, o que resultaria em necrose avascular do tecido ósseo; o favorecimento à infecção induzido pelos BPs, os quais aumentam sobremaneira a capacidade de adesão e colonização de bactérias ao tecido ósseo exposto; e o efeito citotóxico dos BPs sobre as células dos tecidos que compõem a mucosa bucal, o que resulta na diminuição da capacidade de reparo dos tecidos moles (para revisão RUGGIERO et al., 2014; ALLEN & BURR, 2009). Todavia, muitas são as hipóteses e poucas são as comprovações científicas (ALLEN & BURR, 2009). Reid et al. (2007) postularam que os BPs que se acumulam no tecido ósseo, após uma exodontia são liberados em maior quantidade no sítio cirúrgico, o que poderia exercer um efeito citotóxico sobre os tecidos moles da mucosa sobrejacente, comprometendo o processo de reparo destes tecidos e ocasionando como consequência uma exposição óssea prolongada, o que favoreceria o estabelecimento de infecção e posteriormente a ocorrência da necrose óssea (REID et al., 2007). Baseando-se na proposição de tais autores estudos in vitro começaram a explorar os efeitos dos BPs sobre as células do tecido epitelial e do tecido conjuntivo da mucosa bucal. Os estudos in vitro demonstraram que os BPs exercem um potente efeito negativo sobre proliferação e a viabilidade de queratinócitos e fibroblastos (ACIL et

al., 2012; RAVOSA et al., 2011; SCHEPER et al., 2009a; DONETTI et al., 2013; OHNUKI et al., 2012; SAITO et al., 2013; SARACINO et al., 2012; SCHELLER et al., 2011). Em contrapartida, Renò et al. reportaram recentemente que baixas concentrações dos BPs, ácido zoledrônico e ácido neridrônico, não afetaram a viabilidade de queratinócitos e ainda foram capazes de estimular a proliferação destas células (RENO et al., 2012; RENO et al., 2013).

Estudos in vivo com essa abordagem são escassos e contraditórios. Enquanto alguns autores demonstraram que o reparo dos tecidos moles subjacentes ao sítio de extração dental não é alterado pelo tratamento com BPs (VASCONCELOS et al., 2012; YAMASHITA et al. 2010), outro reporta a ocorrência de extensa necrose tecidual nos tecidos moles adjacentes aos alvéolos dentais quando ocorreu o tratamento com BPs (SENEL et al., 2010).

Embora a maioria dos estudos in vitro corroborem entre si, e inclusive fundamentem, a hipótese postulada por Reid et al., deve-se levar em consideração que em tais estudos se tem um controle exato da quantidade de BPs a que as células estão expostas, o que não ocorre em estudos in vivo. Além disso, a interação das células entre si e com a microbiota da cavidade bucal é extremamente simplificada mesmo em culturas de células mais complexas. Diante disso, os estudos in vivo são fundamentais para verificar se há correlação entre BPs, reparação de tecidos moles, e a etiopatogenia da ONM-M (BPs). No entanto, mais estudos in vivo se fazem necessários para se averiguar esta questão, tendo em vista que estes, além de escassos, se mostram incompletos e incongruentes entre si. Uma vez comprovada a hipótese poderia se pensar em tais tecidos como alvo de uma terapia preventiva. A limitada compreensão da etiopatogenia restringem sobremaneira a prevenção e o tratamento da ONM-M (BPs).

Atualmente tem sido sugerida a prescrição de antibioticoterapia profilática em pacientes que fazem uso crônico de BPs e necessitam de intervenções odontológicas invasivas, especialmente exodontia (HOEFERT & EUFINGER, 2011; LITTLE et al., 2008; LOPEZ-JORNET et al., 2011). No entanto, alguns estudos em animais e em humanos demonstraram que a antibioticoprofilaxia pode falhar na prevenção da ocorrência de ONM-M (BPs) (HOEFERT & EUFINGER, 2011; LOPEZ-JORNET et al., 2011). Isso ocorre justamente por que tal conduta está baseada no empirismo, pois não há comprovação científica de que a ONM-M (BPs) seja um evento desencadeado ou sustentado por um processo infeccioso, o que explicaria o insucesso da

antibioticoterapia profilática. Soma-se a isso o fato de o uso inadequado de um antimicrobiano na antibioticoprofilaxia poder ser capaz de gerar cepas de bactérias antibiótico-resistentes, predispor ao desenvolvimento de superinfecções, ocasionar reações alérgicas e interagir com outras drogas, especialmente em pacientes oncológicos cujo tratamento envolve a utilização concomitante de diversos medicamentos para tratamento da doença de base (KUNIN et al., 1990; LITTLE et al., 2008; PAGE et al., 1993).

Com relação ao tratamento da ONM-M (BPs), atualmente este tem sido efetuado por diferentes abordagens clínicas, as quais têm se baseado exclusivamente no estadiamento clínico da doença, e compreendem desde bochechos com gluconato de clorexidina 0,12%, antibioticoterapia prolongada, até debridamento cirúrgico da lesão, que em alguns casos pode consistir em mandibulectomia ou maxilectomia parcial (HANASONO et al., 2013; LAM et al., 2007; RUGGIERO et al., 2009; WEITZMAN et al., 2007).

Por serem os BPs, especialmente os mais potentes, utilizados como medicamentos coadjuvantes ao tratamento de doenças extremamente graves e debilitantes, a ocorrência da ONM-M e, até mesmo a sua terapia, comprometem substancialmente ou provocam a interrupção do tratamento da doença de base e a qualidade de vida do paciente. Em decorrência do envelhecimento da população a utilização dos BPs será cada vez mais frequente, por se tratar de uma das únicas alternativas terapêuticas para algumas osteopatias comuns na terceira idade. Portanto, os pacientes que fazem uso crônico de BPs serão cada vez mais comuns no consultório odontológico, e por muitas vezes necessitarão de intervenções odontológicas potencialmente capazes de desencadear ONM-M (BPs). Diante disso a busca por uma terapia preventiva ou um tratamento efetivo se fazem necessários, no entanto, isso somente será possível de forma eficaz e segura após a elucidação da etiopatogenia da ONM-M (BPs).

2. Objetivo

O objetivo do presente estudo foi avaliar in vivo o efeito da terapia crônica com ácido zoledrônico sobre o processo de reparo dos tecidos moles sobrejacentes ao sítio de extração dental em ratas que apresentavam os principais fatores de risco para o desenvolvimento de ONM-M. Tal avaliação consistiu em análise histopatológica do processo de reparação tecidual; análise histométrica da área ocupada por tecido epitelial (ATE) e da área ocupada por tecido conjuntivo (ATC) no sítio cirúrgico, análise histoquímica do nível de maturação das fibras colágenas na lâmina própria e, análise imunoistoquímica de PCNA, um biomarcador de proliferação celular.

3. Metodologia

No presente trabalho foram utilizadas 14 ratas senis (20 meses de idade) da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) com peso corporal compreendido entre 350 – 450g. Os animais foram obtidos no Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (FOA - UNESP) e posteriormente foram mantidos no Biotério de Experimentação da Disciplina de Histologia e Embriologia da FOA - UNESP sob as seguintes condições: ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, temperatura ambiente de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sistema de ventilação/exaustão permitindo 20 trocas de ar por hora, umidade relativa do ar em torno de $55 \pm 5\%$, acondicionamento em gaiolas plásticas (3 – 4 animais por gaiola), onde tiveram livre acesso ao alimento e à água. Foram tomadas todas as medidas cabíveis para se minimizar o número de animais utilizados, assim como evitar o seu sofrimento. Os procedimentos de manipulação experimental foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo “Guide to the care and use of experimental animals” e “Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal” (CONCEA), e o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FOA - UNESP (PROCESSO CEUA Nº 00581-2013).

3.1. Delineamento experimental

3.1.1. Protocolo de habituação dos animais

Ao serem trazidos do Biotério Central para o Biotério de Experimentação todos os animais passaram por um período de habituação. A principal finalidade foi promover a sua familiarização com o ambiente e com o operador, e minimizar o estresse provocado por algumas manobras pré-operatórias. Tal protocolo compreendeu os 14 dias que antecederam o início do delineamento dos grupos experimentais, sendo que neste período, com um intervalo de dois dias, cada animal foi suavemente manuseado entre as mãos do operador durante um minuto, no qual regularmente aplicou-se manobras de restrição que simularam aquelas empregadas no protocolo medicamentoso.

3.1.2. Anestesia

Para a instalação da ligadura, execução da exodontia do primeiro molar inferior esquerdo e eutanásia os animais foram anestesiados, via injeção intramuscular de cloridrato de cetamina (80 mg/Kg, Francotar®, Virbac, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg, Rompum®, Bayer, RS, Brasil).

3.1.3. Periodontite induzida por ligadura

Um dia antes do início do plano de tratamento medicamentoso foi instalada uma ligadura de algodão (fio de algodão #24; Coats Corrente, SP, Brasil) ao redor do primeiro molar inferior esquerdo (Fig 1). A ligadura foi mantida durante três semanas com o intuito de induzir periodontite experimental (PE).

3.1.4. Protocolo medicamentoso

O plano de tratamento medicamentoso teve uma duração total de sete semanas. A administração de veículo ou ácido zoledrônico (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) ocorreu pela via intraperitoneal obedecendo um intervalo de dois dias entre as injeções. A dose de ácido zoledrônico foi de 100µg/Kg, a qual era diluída em 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9%. Tal dose e o plano de tratamento medicamentoso consistiram em uma adaptação para o rato do protocolo empregado atualmente para terapia oncológica de humanos (AGHALOO et al., 2011; KYLE et al., 2007; QUINN, 2005).

3.1.4. Exodontia

Os animais foram posicionados em mesa cirúrgica, a ligadura foi removida, foi executada a anti-sepsia da cavidade bucal, sindesmotomia, luxação e extração do primeiro molar inferior esquerdo com a utilização de instrumentais odontológicos adaptados (Fig 2).

3.1.5. Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos em dois grupos, cada um composto por sete animais: **Grupo SAL:** receberam uma injeção intraperitoneal de 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% a cada intervalo de dois dias, durante sete semanas. Ao completarem a terceira semana de tratamento se realizou a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. Os animais foram submetidos à eutanásia aos 28 dias pós-operatórios (Fig. 3).

Grupo ZOL: receberam uma injeção intraperitoneal de 0,45 ml de ácido zoledrônico (100µg/Kg) diluído em solução de cloreto de sódio 0,9% a cada intervalo de dois dias, durante sete semanas. Ao completarem a terceira semana de tratamento se realizou a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. Os animais foram submetidos à eutanásia aos 28 dias pós-operatórios (Fig. 3).

3.1.6. Eutanásia e obtenção das amostras

Findado o protocolo medicamentoso os animais foram profundamente anestesiados e submetidos a perfusão transcardíaca com solução salina fisiológica acrescida de 0,1% de heparina (100 ml), seguida de solução fixadora (800 ml) constituída de 4% de formaldeído (Sigma, Saint Louis, MO, USA) em tampão fosfato salino (PBS – Sigma, Saint Louis, MO, USA), 0,1M, 4°C, pH 7,4. As hemimandíbulas foram cuidadosamente dissecadas e submetidas à pós-fixação na mesma solução fixadora durante 72 horas.

3.2. Processamento histológico das amostras

As hemimandíbulas foram submetidas à lavagem e imersas em solução desmineralizadora (constituída de PBS acrescida de 10% de ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA, durante 30 dias). Após a desmineralização, as peças foram lavadas, desidratadas, diafanizadas, impregnadas em parafina, incluídas em parafina e seccionadas em micrótomo com 4 µm de espessura. As amostras foram incluídas de modo que a face lingual do segundo molar inferior esquerdo ficasse paralela com a superfície do bloco do parafina. A microtomia foi executada seguindo um plano de corte que progrediu de lingual para vestibular. Foram coletados os cortes semi-seriados da porção do alvéolo dental e mucosa sobrejacente anteriormente ocupada pelo primeiro molar inferior esquerdo, tendo como orientação as raízes do segundo molar. As secções histológicas foram montadas em lâminas de vidro silanizadas.

Para a análise histopatológica do processo de reparação dos tecidos moles sobrejacentes ao sítio de extração dental e para análise histométrica da área de tecido epitelial (ATE) e área de tecido conjuntivo (ATC) sobre alvéolos dentais as secções histológicas foram submetidas à coloração pela hematoxilina-eosina.

Para a análise histoquímica do nível de maturação das fibras colágenas na lâmina própria sobrejacentes ao sítio de extração dental as secções histológicas foram submetidas à coloração pela vermelho picro sirius.

Para a análise imunoistoquímica os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100° - 100° - 100° - 90° - 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão citrato 0,1 M, pH 7,4 (Diva decloaker®, Biocare Medical, Concord, CA, EUA), em câmara pressurizada (Decloaking chamber®, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) a 95°C, por 20 minutos. No final de cada etapa da reação imunoistoquímica, as lâminas histológicas foram lavadas em PBS 0,1 M, pH 7,4. Posteriormente, as lâminas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e 1% de soro albumina bovino por 12 horas para bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. As lâminas contendo amostras de cada grupo experimental foram incubadas com anticorpo primário anti-PCNA do rato gerado em camundongo (VP-P980, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA). Os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado por 2 horas e subsequentemente tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte - HRP por 1 hora (Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA). A revelação foi realizada utilizando como cromógeno o 3,3'-tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA). Foi realizada a contracoloração com *Fast green* e em seguida a desidratação em etanol, diafanização em xilol e, recobrimento com meio de montagem (Permount, Fisher Scientific, San Diego, CA, USA) e lamínulas de vidro. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização do anticorpo primário.

3.3. Análise dos resultados

Foram utilizadas três secções histológicas equidistantes para se efetuar cada uma das análises propostas. Em cada secção foi analisada uma área de 4mm² (2mm x 2mm) da mandíbula situada na porção mesial do segundo molar inferior esquerdo, calculada tomando-se como base a dimensão ocupada pelo primeiro molar inferior e de seu respectivo alvéolo em ratas com 20 meses de idade (estudo previamente realizado no Laboratório de Osteobiologia Aplicada à Odontologia).

3.3.1. Análise histopatológica do processo de reparação tecidual

A análise histopatológica foi efetuada por um histologista certificado (Prof. Dr. Edilson Ervolino) avaliando-se os seguintes parâmetros: grau de inflamação, presença e extensão de necrose tecidual, presença e extensão de sequestro ósseo, estado da

vasculatura, padrão de celularidade do tecido epitelial, conjuntivo e ósseo e padrão de estruturação da matriz extracelular do tecido conjuntivo e ósseo.

3.3.2. Análise histométrica da ATE e ATC

Para a análise histométrica da ATE e ATC sobre os alvéolos dentais foram capturadas imagens da área descrita acima via utilização de uma câmera digital (AxioCam MRc5, Carl Zeiss) acoplada ao microscópio óptico (Axiolab, Carl Zeiss) e conectada a um microcomputador. Com auxílio do programa de análise de imagens (ImageLab®, Diracom) foi mensurada a área ocupada por tecido epitelial e a área ocupada por tecido conjuntivo. A ATE e a ATC foram expressas em mm² e como média $\pm$ desvio padrão em cada grupo experimental.

3.3.2. Análise do nível de maturação da fibras colágenas

A análise histoquímica do nível de maturação das fibras colágenas na lâmina própria da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental foi realizada em microscopia de luz polarizada com o auxílio do programa de análise de imagens (ImageLab®, Diracom). Foi mensurada a área ocupada pelas diferentes cores (verde-amarelo, laranja-vermelho), que refletem o nível de maturação do colágeno. A área ocupada por verde-amarelo (fibras colágenas imaturas) e laranja-vermelho (fibras colágenas maduras) foi expressa em porcentagem como média $\pm$ desvio padrão.

3.3.3. Análise imunoistoquímica de PCNA

A análise imunoistoquímica foi realizada no tecido epitelial e no tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental com o auxílio do programa de análise de imagens (ImageLab®, Diracom). Foi mensurada a quantidade de células PCNA-positivas por mm². Os valores da imunomarcação foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

3.3.5. Análise estatística dos dados

Para a análise estatística dos dados foi utilizado programa GraphPad Prism 6. Empregou o teste T de Student e o nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

4. Resultados

4.1. Condição geral de saúde e exame clínico intrabucal

Das 14 ratas empregadas no início do presente estudo, foram consideradas 13 ratas, 6 em SAL e 7 em ZOL. As condições gerais de saúde das ratas consideradas neste estudo se mantiveram constantes durante todo o período experimental. As ratas toleraram muito bem o procedimento cirúrgico de exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. Ao final dos períodos experimentais não houve diferença significativa no peso corporal médio das ratas entre SAL (352 ± 12) e ZOL (343 ± 6) (Fig. 4). Não houve diferença significativa no peso corporal das ratas de um mesmo grupo ao longo do período experimental. A maioria das ratas apresentou uma leve redução do peso corporal após a exodontia, todavia houve um rápido restabelecimento.

Ao exame clínico intrabucal não foi constatada nenhuma alteração macroscópica na cavidade bucal e no sítio de extração dental em SAL. Em ZOL observou-se pequena exposição óssea no sítio de extração em três ratas aos 28 dias pós-operatórios, as demais exibiram características que se apresentaram similares ao grupo SAL, todavia a dimensão da loja cirúrgica se apresentou maior, reflexo de um nítido atraso no processo de reparo alveolar

4.2. Aspecto histológico dos tecidos moles durante o processo de reparação tecidual

No grupo SAL os alvéolos dentais se mostraram recobertos por tecido epitelial (Fig. 5) associado a tecido conjuntivo rico em fibroblastos, fibras colágenas, vasos sanguíneos e com raras células inflamatórias (Fig. 5). O interior dos sítios de extração se mostrou, na maioria espécimes, preenchido por grande quantidade de tecido ósseo, composto por trabéculas ósseas de moderada espessura envolvendo pequenos espaços medulares preenchidos por tecido conjuntivo frouxo (Fig. 5). Não se constatou áreas de osso não vital neste grupo.

No grupo ZOL constatou-se grande ulceração na mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental, com ausência de restituição completa do tecido epitelial (Fig. 5) e persistência de inflamação na lâmina própria (Fig. 5). O interior do sítio de extração se mostrou preenchido por pequena quantidade de tecido ósseo trabecular e grande quantidade de tecido conjuntivo. O tecido ósseo no sítio de extração se mostrou constituído por delgadas trabéculas ósseas e amplas espaços medulares. O tecido

conjuntivo no sítio de extração se apresentou composto por grande quantidade de células inflamatórias, moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de vasos sanguíneos, e pequena quantidade de fibras colágenas (Fig. 5). Nas adjacências do alvéolo dental constatou-se inúmeras e extensas áreas de osso não vital entremeadas com osso vital. Neste grupo todos os espécimes apresentavam áreas de osso necrosado envoltas por grande quantidade de células inflamatórias, predominantemente linfócitos, e circunscrito por colônias microbianas. Alguns espaços medulares nestas áreas se mostravam totalmente ocupados por infiltrado inflamatório e bactérias.

4.2. ATE e ATC

A ATE foi de $100,2 \pm 16,2 \text{ mm}^2$ em SAL e de $55,0 \pm 24,8 \text{ mm}^2$ em ZOL (Fig. 5) enquanto que a ATC foi de $234,8 \pm 58,1 \text{ mm}^2$ em SAL e de $135,8 \pm 45,2 \text{ mm}^2$ em ZOL (Fig. 5). ATE e ATC se apresentaram significativamente menores do ponto de vista estatístico em ZOL ($p < 0,05$).

4.3. Nível de maturação das fibras colágenas

A porcentagem de fibras colágenas imaturas na mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental foi significativamente maior em ZOL ($83,3 \pm 6,1\%$) quando comparado com SAL ($12,7 \pm 3,1\%$) ao passo que a porcentagem de fibras colágenas maduras foi significativamente maior em SAL ($87,3 \pm 3,1\%$) em relação à ZOL ($16,7 \pm 6,1\%$).

4.5. Padrão de imunomarcacão para PCNA

A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de PCNA mostrou alta especificidade na detecção dessa proteína, a qual foi comprovada pela ausência total de marcação no controle negativo da reação imunoistoquímica.

As células imunorreativas apresentaram uma coloração marrom escuro confinada ao núcleo e estava presente predominantemente em queratinócitos e fibroblastos.

A quantidade de células PCNA-positivas no tecido epitelial da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental foi de: $62,00 \pm 7,00$, em SAL e $21,33 \pm 4,04$, em ZOL. A quantidade de células PCNA-positivas no tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental foi de: $18,67 \pm 2,08$, em SAL e $4,33 \pm 1,53$, em ZOL. Em

ambos os tecidos ZOL apresentou uma quantidade de células PCNA-positivas significativamente menor que SAL ($p < 0,05$).

5. Discussão

O ácido zoledrônico consiste na primeira linha de fármacos utilizados para o tratamento de algumas osteopatias ou controle da progressão de metástase óssea, hipercalcemia e dor óssea em neoplasias malignas osteotrópicas. Entre seus efeitos adversos está o desencadeamento da ONM-M (BPs), a qual é mais frequentemente associada ao uso do ácido zoledrônico em função de sua potência relativa ser a maior deste grupo farmacológico. A etiopatogenia desta condição é pobremente compreendida, o que dificulta sua prevenção e tratamento. Com o intuito de compreender sua etiopatologia o presente estudo estabeleceu e avaliou alguns parâmetros em um modelo experimental animal que reuniu os principais fatores de risco para a ONM-M (BPs). Constatamos que o ácido zoledrônico compromete significativamente o processo de reparo dos tecidos moles sobrejacentes ao sítio de extração dental, o que resultaria em exposição óssea, infecção e consequentemente osteonecrose.

As primeiras descrições de ONM-M (BPs) são datada de 2003 (MARX, 2003; MIGLIORATI, 2003), ou seja, há mais de uma década esta condição vem sendo descrita na literatura científica. Ao longo deste período os estudos foram tomando corpo, especialmente em função do crescente número de casos de ONM-M resultantes do seu uso cada vez frequente, especialmente dos BPs. Com isso se conseguiu traçar muito bem o perfil epidemiológico da doença e seus principais fatores de risco (OTTO et al., 2011). Baseado em tais evidências epidemiológicas é que o modelo experimental apresentado neste estudo foi delineado. Vários são os modelos experimentais que empregam BPs e exodontia para analisa sua correlação com a ONM-M, todavia este é o primeiro que reúne concomitantemente os principais fatores de risco para esta condição, ou seja, foram utilizadas ratas com idade avançada (QUINN, 2005), submetidas a um tratamento relativamente longo (quando se considera a espécie utilizada), com ácido zoledrônico, o mais potente dos BPs, na dose utilizada como adjuvante à terapia oncológica, que apresentavam uma condição bucal desfavorável, ou seja, com periodontite experimental, e que por conta de tal comprometimento periodontal, simulando uma situação clínica comum, foram submetidas à exodontia de molar inferior. Neste estudo a presença de extensas áreas de osso não vital entreameadas com osso vital e regiões de osso necrosado, envoltas por células inflamatórias e colônias bacterianas foi observada em todos os espécimes

do grupo ZOL, o que corrobora com a definição de Barba-Recreo et al. 2013. Nossos achados fortalecem a proposta destes autores para o estabelecimento de um conceito de ONM-BPs mais aplicável à pesquisa experimental em animais, baseado no aspecto histológico da lesão, o qual consegue nos fornecer detalhes estruturais, que tanto o aspecto clínico quanto o radiográfico não asseguram, mas que são os critérios conceituais aplicáveis para se definir a doença em pacientes, em função de a avaliação histológica ser algo inviável em todos os sentidos nos humanos. Sendo assim, o modelo experimental proposto, embora tenha obtido exposição óssea prolongada em alguns espécimes do grupo ZOL, demonstrou severas alterações histológicas osteonecroticas na mandíbula em todos os espécimes deste grupo experimental, ou seja, trata-se de um modelo animal adequado para o estudo da ONM-BPs.

Nossos achados histológicos, histométricos e imunoistoquímicos corroboram com o que foi postulado por Reid et al. (2007). Tais autores propuseram que os BPs que se acumulam no tecido ósseo, após uma exodontia são liberados em maior quantidade no sítio cirúrgico, o que poderia exercer um efeito citotóxico sobre os tecidos moles da mucosa sobrejacente, comprometendo o processo de reparo destes tecidos e ocasionando como consequência uma exposição óssea prolongada, o que favoreceria o estabelecimento de infecção e posteriormente a ocorrência da necrose óssea.

A análise histopatológica efetuada no presente estudo evidenciou que o ácido zoledrônico compromete a capacidade de regeneração do tecido epitelial, uma vez que não houve restituição completa deste tecido, mesmo após 28 dias pós-operatórios. Tais achados, em associação com a menor ATE e menor quantidade de células PCNA-positivas deixam claro que o ácido zoledrônico exerce um efeito inibitório sobre a proliferação dos queratinócitos do tecido epitelial sobrejacente ao sítio de extração dental. Tais resultados estão de acordo com estudos *in vitro* que demonstraram que os BPs exercem um efeito negativo sobre os queratinócitos da mucosa bucal. Estes estudos mostraram que os BPs são capazes de diminuir significativamente a proliferação (SAITO et al., 2014; DONETTI et al., 2014; OHNUKI et al., 2012; SARACINO et al., 2012; SCHELLER et al., 2011), capacidade de migração (SAITO et al., 2014; PABST et al., 2012), adesão intercelular (DONETTI ET AL., 2014) e maturação de queratinócitos (DONETTI et al., 2014), eventos essenciais para o processo de regeneração do tecido epitelial. Além disso, a viabilidade dos queratinócitos maduros é consideravelmente prejudicada pelos BPs uma vez que tais

fármacos são capazes de induzir apoptose (PABST et al., 2012; SCHEPER et al., 2009b) e senescência prematura (KIM et al., 2011) em tais células, o que comprometeria a integridade da estrutura do tecido epitelial.

No presente estudo constatamos ainda com a análise histopatológica que o ácido zoledrônico retarda e dificulta sobremaneira a conclusão do reparo do tecido conjuntivo, haja vista que há persistência de infiltrado inflamatório na lâmina própria. Supostamente, como consequência disso a ATC se apresentou significativamente menor em ZOL. Além disso o ácido zoledrônico também exerceu um efeito negativo sobre a proliferação das células conjuntivas. Corroborando com nossos achados, outros estudos in vitro demonstraram efeitos negativos dos BPs sobre fibroblastos da lâmina própria da mucosa bucal. Tais estudos demonstraram que a proliferação (PANSANI et al., 2014; ACIL et al., 2012; RAVOSA et al., 2011; SCHEPER et al., 2009a) é significativamente diminuída quando fibroblastos são expostos a diferentes BPs.

Além de um efeito sobre a proliferação de fibroblastos, verifica-se que os BPs também são capazes de comprometer a função de fibroblastos maduros. Estudos demonstraram que a motilidade e a produção de elementos da matriz extracelular (ACIL et al., 2012; RAVOSA et al., 2011; SIMON et al., 2010), em especial do colágeno, são reduzidos na presença de BPs. Tais dados corroboram com nossos achados, que verificaram que a ATC foi significativamente menor em ZOL. Além disso nosso estudo demonstrou que o ácido zoledrônico retardou o processo de maturação das fibras colágenas da lâmina própria, tendo em vista que houve uma prevalência de fibras colágenas imaturas em ZOL neste território.

Mawardi et al. (2011) verificaram que a exposição concomitante de fibroblastos gengivais humanos ao ácido pamidônico, que também é um BPs, e ao *Fusobacterium nucleatum* é capaz de regular negativamente a expressão do fator de crescimento de queratinócitos, uma molécula produzida por células conjuntivas para regular a proliferação e migração de células epiteliais durante o processo de regeneração deste tecido (MARWARDI et al., 2011). Diante do exposto verifica-se que os BPs interferem inclusive na interação entre tecido epitelial – tecido conjuntivo.

Nossos achados se contrapõem aqueles de Yamashita et al. (2010) e Vasconcelos et al., 2012 que reportaram em um estudo in vivo que o reparo dos tecidos moles da mucosa bucal não foi alterado após tratamento com ácido zoledrônico. No entanto, Yamashita et al. utilizaram um modelo experimental onde, após 12 semanas de

tratamento com ácido zoledrônico, foi retirado um retalho do mucoperiósteo do palato duro ao nível do processo alveolar do primeiro molar superior. Tal modelo experimental deixava desnuda uma área pequena de tecido ósseo íntegro, quando comparada com aquela resultante de uma exodontia, que além submeter a região a um trauma bem mais intenso, também a expõe a uma complexa interação entre o reparo dos tecidos ósseo, hematopoético, conjuntivo e epitelial.

O estudo de Vasconcelos, empregou uma metodologia muito semelhante a empregada no presente trabalho, no entanto, não constataram grandes alterações no processo de reparação dos tecidos moles sobrejacentes ao sítio de extração dental, e concluíram que tais tecidos teriam muito pouco envolvimento com a etiopatogenia da ONM-M (BPs). Supostamente tal incongruência entre os resultados destes autores e os nossos seja resultante da dose utilizada por Vasconcelos et al, possa ter sido a idade dos animais e a presença da PE, tendo em vista que os demais parâmetros foram semelhantes, em especial a dose, que embora tenha sido diferente da empregada no presente estudo, o tempo de tratamento também foi, o que resultou em doses acumulativas nos dois estudos bem semelhantes. No estudo destes autores foram empregadas ratas com três meses de idade, onde o processo de reparo tecidual é bem mais efetivo, ao passo que em nosso estudo, com a finalidade de aproximação com os principais fatores de risco da ONM-M (BPs), empregou ratas com 20 meses de idade, onde o envelhecimento já imprime limitação ao processo de reparação. Além disso, o fato de termos a PE instalada, ou seja, a presença de inflamação/infecção prévia à exodontia pode também ter colaborado para resultados nossos estudos.

Outro estudo in vivo, demonstrou um resultados contraditórios e estes (SENEL et al., 2010), e corroboram parcialmente com nossos achados. Senel et al. a ocorrência de extensa necrose tecidual nos tecidos moles adjacentes aos alvéolos dentais quando ocorreu o tratamento com BPs, no entanto, no presente estudo as reações teciduais não foram tão exacerbadas.

A persistência da inflamação, o efeito negativo sobre a proliferação das células do tecido conjuntivo, o comprometimento da viabilidade das células conjuntivas maduras, em especial no que se refere ao retardo na fibrilogênese do colágeno geram prejuízo para todo o reparo da mucosa bucal. Tais eventos são fundamentais para que a ferida cirúrgica seja ocupada por tecido de granulação, sem o qual não se estabelece o processo de reparo do tecido conjuntivo e nem a regeneração epitelial da área, que necessita deste tecido como substrato de sustentação. Além disso, estudos têm

reportado que especialmente os BPs que contém nitrogênio provocam um aumento significativo na ocorrência de apoptose em fibroblastos da mucosa bucal (RAVOSA et al., 2011; SCHEPER et al., 2010; SCHEPER et al., 2009a; SIMON et al., 2010; WALTER et al., 2011), o que agrava ainda mais esta condição.

Efeitos negativos do ácido zoledrônico sobre tecidos moles puderam ser comprovado neste estudo in vivo. Supostamente tais efeitos colaboram para o desencadeamento da ONM-M (BPs). Diante disso, contrariamente ao que vem ocorrendo atualmente, onde atenção fica voltada quase que exclusivamente ao tecido ósseo nos casos de ONM-M, maior importância deve ser dada aos tecidos moles sobrejacentes a estes sítios, tendo em vista que estimular a capacidade de reparação do tecido epitelial e do tecido conjuntivo pode evitar o comprometimento do tecido ósseo, e ser uma estratégia preventiva eficaz para se evitar o desencadeamento da OMN-M (BPs).

6. Conclusão

Dentro dos limites do presente estudo concluímos que ácido zoledrônico é capaz de comprometer significativamente o processo de reparo dos tecidos moles subjacentes ao sítio de extração dental e, este efeito negativo do medicamento sobre tais tecidos colabora para o desencadeamento da ONM-M (BPs).

Figuras

Figura 1

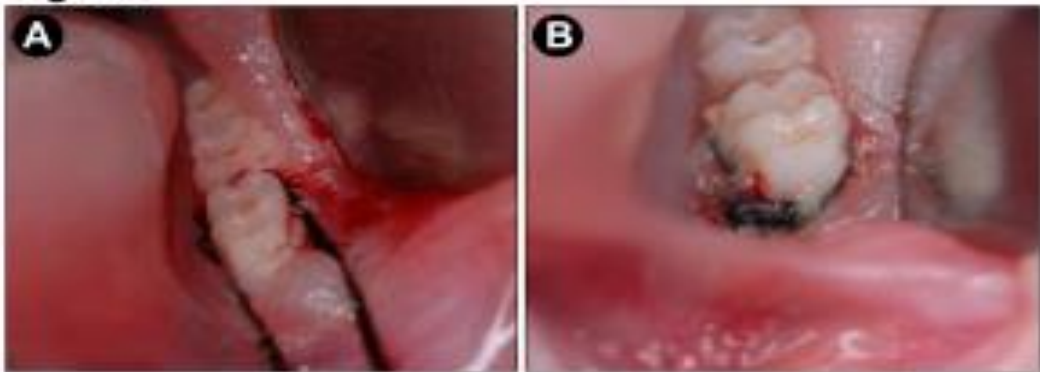


Figura 2

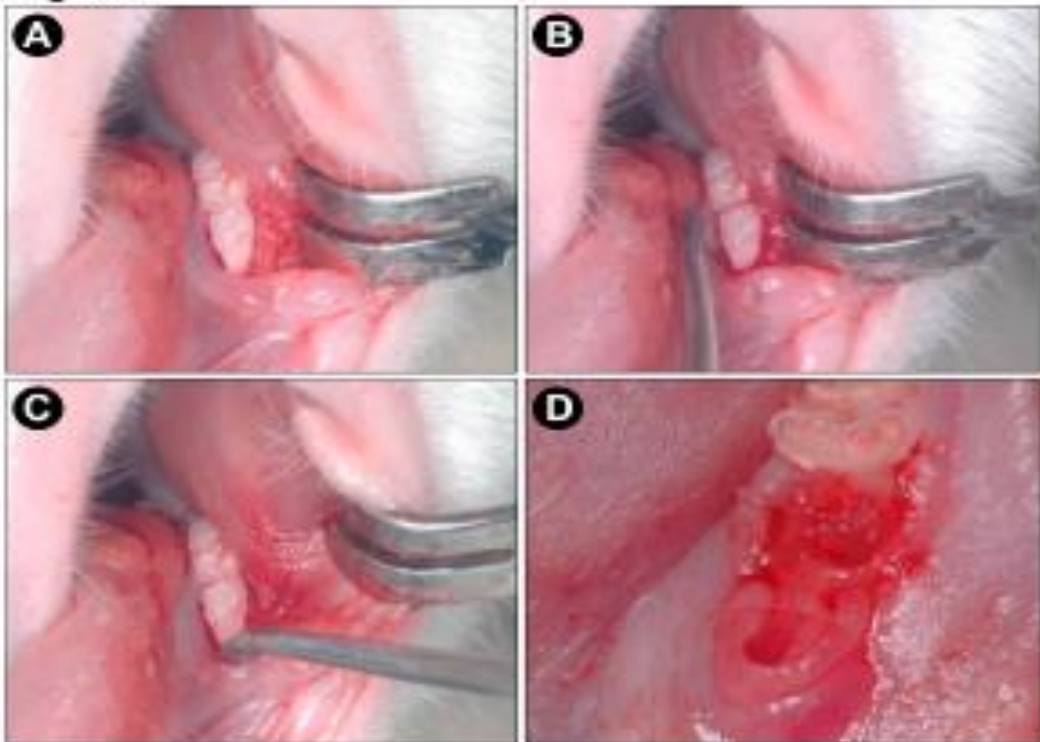


Figura 3

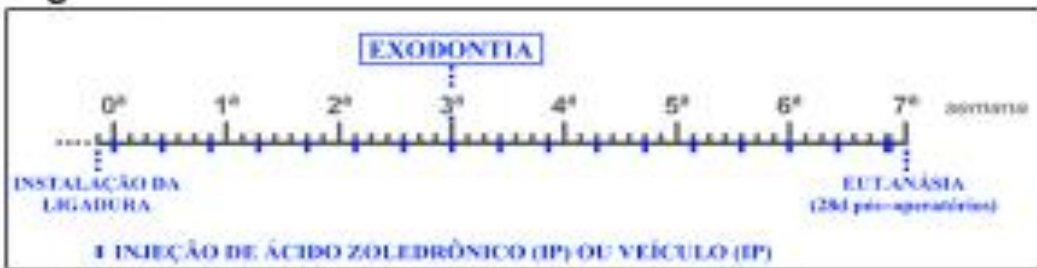


Figura 4



Figura 5

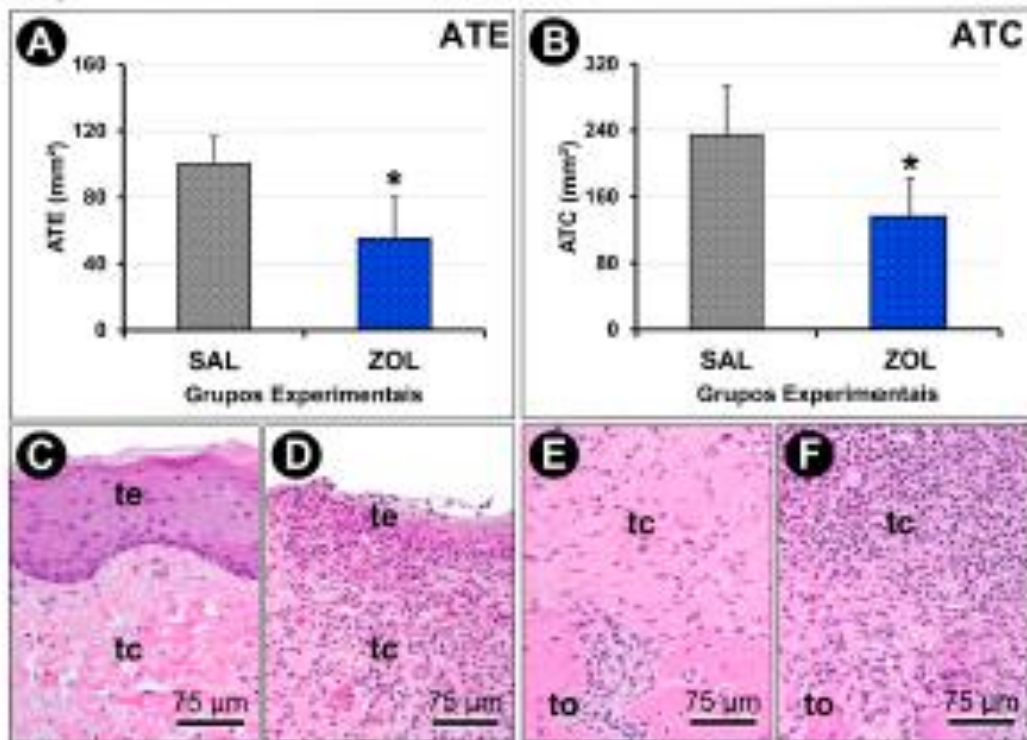


Figura 6

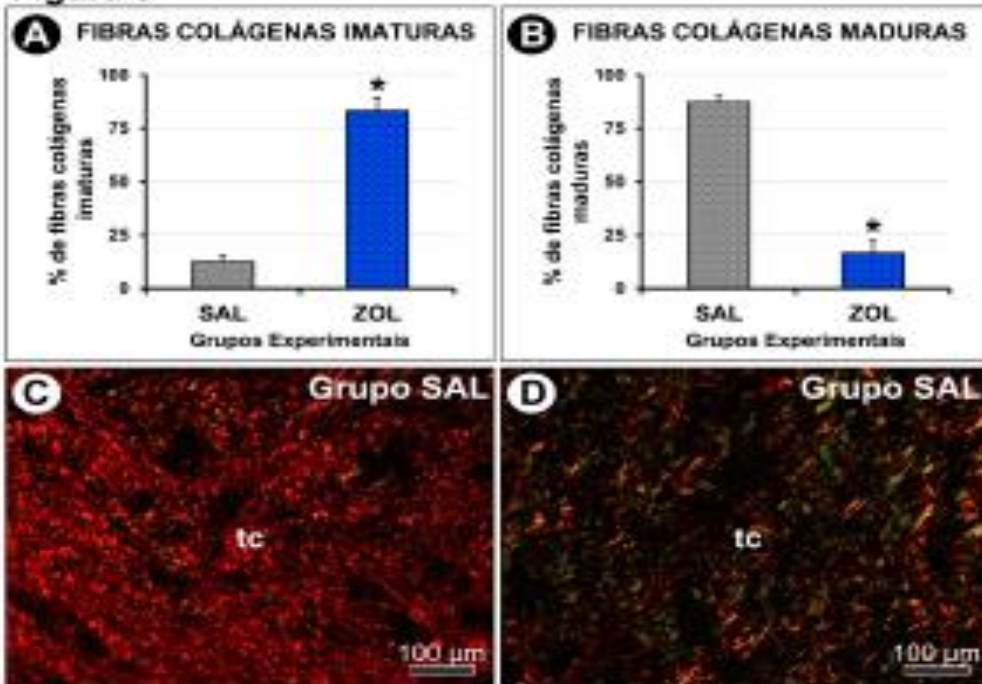
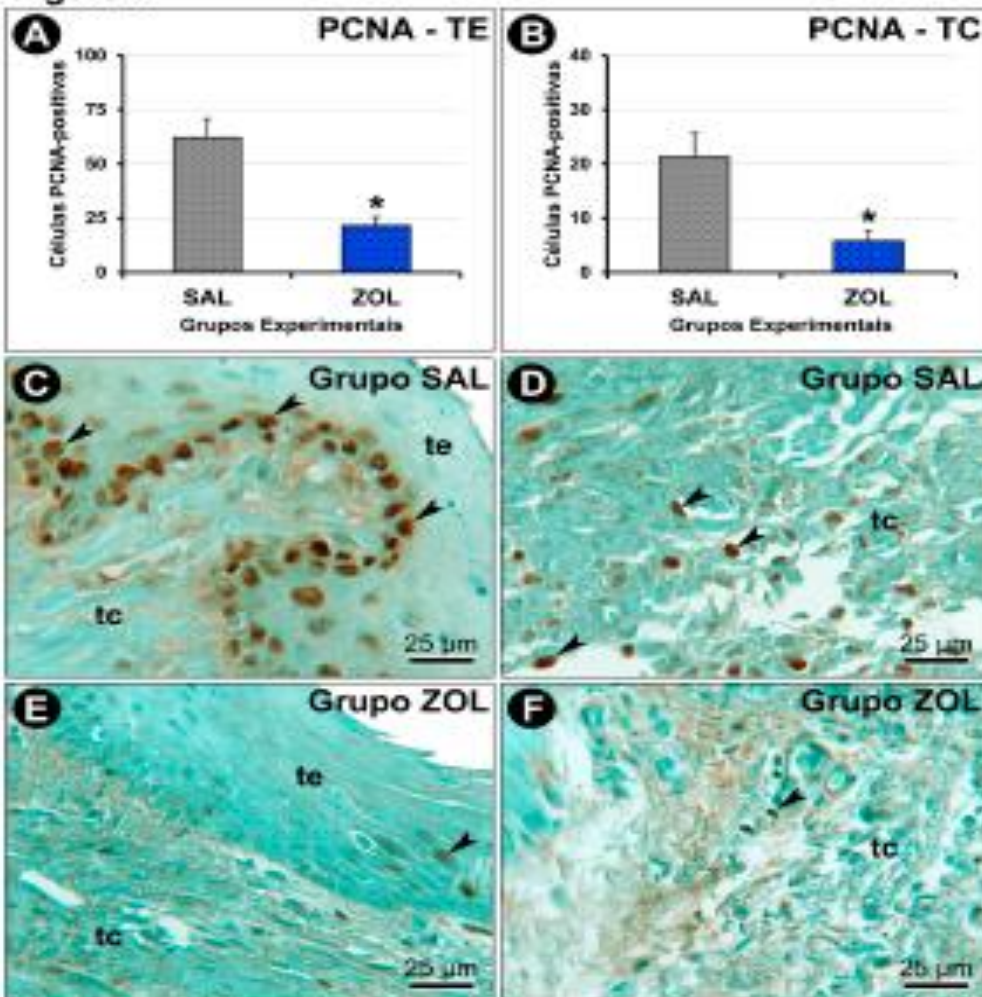


Figura 7



Referências

- ABE, K.; YOSHIMURA, Y.; DEYAMA, Y.; KIKUIRI, T.; HASEGAWA, T.; TEI, K.; SHINODA, H.; SUZUKI, K.; KITAGAWA, Y. Effects of bisphosphonates on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. **Int J. Mol. Med.**, v. 29, n.6, p.1007-1015, jun. 2012.
- ACIL, Y.; MOLLER, B.; NIEHOFF, P.; RACHKO, K.; GASSLING, V.; WILTFANG, J.; SIMON, M. J. The cytotoxic effects of three different bisphosphonates in-vitro on human gingival fibroblasts, osteoblasts and osteogenic sarcoma cells. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, v.40, n.8, p.e229-235, dez. 2012
- AGHALOO, T. L.; KANG, B.; SUNG, E. C.; SHOFF, M.; RONCONI, M.; GOTCHER, J. E.; BEZOUGLAIA, O.; DRY, S. M.; TETRADIS, S. Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. **J. Bone Miner. Res.**, v.26, n.8, p.1871-1882, ago. 2011.
- AGUIRRE, J. I.; AKHTER, M. P.; KIMMEL, D. B.; PINGEL, J. E.; WILLIAMS, A.; JORGENSEN, M.; KESAVALU, L.; WRONSKI, T. J. Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in rice rats (*Oryzomys palustris*) with periodontitis. **J. Bone Miner. Res.**, v.27, n. 10, p. 2130-43, oct. 2012.
- ALLEN, M. R.; BURR, D. B. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.67(5 Suppl), p.61- 70, mai .2009
- BARBA-RECREO, P.; DEL CASTILLO PARDO DE VERA, J. L.; GARCÍA-ARRANZ, M.; YÉBENES, L.; BURGUEÑO, M.J.. Zoledronic acid - related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. **Craniomaxillofac. Surg.**, v. 42, n.6, p. 744-50, set. 2014
- COXON, F. P.; ROGERS, M. J.; The role of prenylated small GTP-binding proteins in the regulation of osteoclast function. **Calcif. Tissue Int.**, v.72, n.1, p.80-84, jan. 2003.
- DONETTI, E.; GUALERZI, A.; SARDELLA, A.; LODI, G.; CARRASSI, A.; SFORZA, C. Alendronate impairs epithelial adhesion, differentiation and proliferation in human oral mucosa. **Oral Dis.**, v.20, n.5, p.466-72, jul. 2013.
- DONETTI, E.; GUALERZI, A.; SARDELLA, A.; LODI, G.; CARRASSI, A.; SFORZA, C. Alendronate impairs epithelial adhesion, differentiation and proliferation in human oral mucosa. **Oral Dis.**, v.20, n.5, p.466-72, jul. 2014.

- DRAKE, M. T.; CLARKE, B. L.; KHOSLA, S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. **Mayo Clin. Proc.**, v.83, n.9, p.1032-1045, set. 2008.
- DUNFORD, J. E.; THOMPSON, K.; COXON, F. P.; LUCKMAN, S. P.; HAHN, F. M.; POULTER, C. D.; EBETINO, F. H.; ROGERS, M. J. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.296, n.2, p.235-242, fev. 2001
- EBETINO, F. H.; HOGAN, A. M.; SUN, S.; TSOUMPRAS, M. K.; DUAN, X.; TRIFFITT, J. T.; KWAASI, A. A.; DUNFORD, J. E.; BARNETT, B. L.; OPPERMAN, U.; LUNDY, M. W.; BOYDE, A.; KASHEMIROV, B. A.; MCKENNA, C. E.; RUSSELL, R. G. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. **Bone**, v.49, n.1, p.20-33, jul. 2011.
- GOMEZ, F. R.; MARTINEZ, G. M. L.; OLMOS, M. J. M. Osteonecrosis of the jaws due to bisphosphonate treatments. **Update. Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v.13, n.5, p.E318-324, mai. 2008.
- HANASONO, M. M.; MILITSAKH, O. N.; RICHMOND, J. D.; ROSENTHAL, E. L.; WAX, M. K. Mandibulectomy and free flap reconstruction for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. **JAMA Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v.139, n.11, p.1135-1142, nov. 2013.
- HOEFERT, S.; EUFINGER, H. Relevance of a prolonged preoperative antibiotic regime in the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.69, n.2, p.362-380, fev. 2011.
- KANG, B.; CHEONG, S.; CHAICHANASAKUL, T.; BEZOUGLAIA, O.; ATTI, E.; DRY, S. M.; PIRIH, F. Q.; AGHALOO, T. L.; TETRADIS, S. Periapical disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in mice. **J. Bone Miner. Res.**, v.28, p.1631-40, jul. 2013.
- KIM, J. W.; KONG, K. A.; KIM, S. J.; CHOI, S. K.; CHA, I.H.; KIM, M. R. Prospective biomarker evaluation in patients with osteonecrosis of the jaw who received bisphosphonates. **Bone**, v.57, n.1, p.201-205, nov. 2013.
- KIM, R. H.; LEE, R. S.; WILLIAMS, D.; BAE, S.; WOO, J.; LIEBERMAN, M.; OH, J. E.; DONG, Q.; SHIN, K. H.; KANG, M. K.; PARK, N. H. Bisphosphonates induce senescence in normal human oral keratinocytes. **J. Dent. Res.**, v.90, n.6, p.810-816, nov. 2011.

- KUNIN, C. M.; JOHANSEN, K. S.; WORNING, A. M.; DASCHNER, F. D. Report of a symposium on use and abuse of antibiotics worldwide. **Ver. Infect. Dis.**, v.12, n.1, p.12-19, jan-fev. 1990.
- KYLE, R. A.; YEE, G. C.; SOMERFIELD, M. R.; FLYNN, P. J.; HALABI, S.; JAGANNATH, S.; ORLOWSKI, R. Z.; ROODMAN, D. G.; TWILDE, P.; ANDERSON, K. American Society of Clinical Oncology 2007 clinical practice guideline update on the role of bisphosphonates in multiple myeloma. **J. Clin. Oncol.**, v.25, n.17, p.2464-2472, jun. 2007.
- LAM, D. K.; SANDOR, G. K.; HOLMES, H. I.; EVANS, A.W.; CLOKIE, C. M. A review of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws and its management. **J. Can. Dent. Assoc.**, v.73, n.5, p.417-422, jun. 2007.
- LINDHE, J; KARRING, T; LANG, N. P. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 4ª ed. – Rio de Janeiro - Guanabara Koogan, 2005.
- LITTLE, J. W.; FALACE, D. A.; MILLER, C. S.; RHODUS, N. L. Antibiotic prophylaxis in dentistry: an update. **Gen. Dent.**, v.56, n.1, p.20-28, jan-fev. 2008.
- LOPEZ-JORNET, P.; CAMACHO-ALONSO, F.; MARTINEZ-CANOVAS, A.; MOLINA-MINANO, F.; GOMEZ-GARCIA, F; VICENTE-ORTEGA, V. Perioperative antibiotic regimen in rats treated with pamidronate plus dexamethasone and subjected to dental extraction: a study of the changes in the jaws. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.69, n.10, p.2488-2493, oct. 2011.
- LUCKMAN, S. P.; HUGHES, D. E.; COXON, F. P.; GRAHAM, R.; RUSSELL, G.; ROGERS, M. J. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. **J. Bone Miner. Res.**, v.13, n.4, p.581-589, abr. 1998
- MARX, R. E.; CILLO, J. E.; JR., ULLOA, J. J. Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. **J. Oral Maxillofac. Surg.** v.65, n.12, p.2397-2410, dez. 2007.
- MARX, R. E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 61, n. 9, p. 115-7, set. 2003.
- MAWARDI, H.; TREISTER, N.; RICHARDSON, P.; ANDERSON, K.; MUNSHI, N.; FAIELLA, R. A.; WOO, S. B. Sinus tracts--an early sign of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws? **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 67, n.3, p.593-601, mar. 2009.

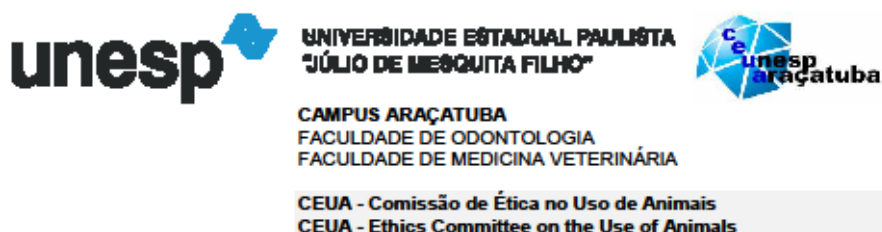
- MAWARDI, H.; GIRO, G.; KAJIYA, M.; OHTA, K.; ALMAZROOA, S.; ALSHWAIMI, E.; WOO, S. B.; NISHIMURA, I.; KAWAI, T. A role of oral bacteria in bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. **J. Dent. Res.**, v.90, n.11, p.1339-1345, nov. 2011.
- MIGLIORATI, C. A. Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis. **J. Clin. Oncol.**, v.21, n.22, p.4253-4, nov. 2003.
- OHNUKI, H.; IZUMI, K.; TERADA, M.; SAITO, T.; KATO, H.; SUZUKI, A.; KAWANO, Y.; NOZAWA-INOUE, K.; TAKAGI, R.; MAEDA, T. Zoledronic acid induces S-phase arrest via a DNA damage response in normal human oral keratinocytes. **Arch. Oral Biol.**, v.57, n.7, p.906-917, jul. 2012.
- ORY, S.; BRAZIER, H.; PAWLAK, G.; BLANGY, A. Rho GTPases in osteoclasts: orchestrators of podosome arrangement. **Eur. J. Cell Biol.**, v.87, n.8-9, p.469-477, set. 2008.
- OTTO, S.; SOTLAR, K.; EHRENFELD, M.; PAUTKE, C. Osteonecrosis of the jaw as a possible rare side effect of annual bisphosphonate administration for osteoporosis: A case report. **J. Med. Case Rep.**, v.23, n.5, p.477, set. 2011.
- PABST, A. M.; ZIEBART, T.; KOCH, F. P.; TAYLOR, K.Y.; AL-NAWAS, B.; WALTER, C. The influence of bisphosphonates on viability, migration, and apoptosis of human oral keratinocytes--in vitro study. **Clin. Oral Investig.**, v.16, n.1, p:87-93, fev. 2012.
- PAGE, C. P.; BOHNEN, J. M.; FLETCHER, J. R.; MCMANUS, A. T.; SOLOMKIN, J. S.; WITTMANN, D. H. Antimicrobial prophylaxis for surgical wounds. Guidelines for clinical care. **Arch. Surg.**, v.128, n.1, p.79-88, jan. 1993.
- PANSANI, T. N.; BASSO, F. G.; TURIRIONI, A. P.; KURACHI, C.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C. A. Effects of low-level laser therapy on the proliferation and apoptosis of gingival fibroblasts treated with zoledronic acid. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 43, n.8, p. 1030-4, ago. 2014.
- QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? **Nutrition**, v.21, n.6, p.775-777. 2005.
- RAVOSA, M. J.; NING, J.; LIU, Y.; STACK, M. S. Bisphosphonate effects on the behaviour of oral epithelial cells and oral fibroblasts. **Arch. Oral Biol.**, v.56, n.5, p.491-498, mai. 2011
- REID, I. R.; BOLLAND, M. J.; GREY, A. B. Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? **Bone**, v.41, n.3, p.318-320, mai. 2007.

- RENO, F.; MIGLIARIO, M.; RIZZI, M.; INVERNIZZI, M.; CISARI, C.; CANNAS, M. Low concentration amino-bisphosphonates stimulate human keratinocyte proliferation and in vitro wound healing. **Int. Wound J.**, v.9, n.4, p.442-450, ago. 2012.
- RENO, F.; RIZZI, M.; INVERNIZZI, M.; MIGLIARIO, M.; CISARI, C. Low doses amino-bisphosphonates stimulate keratinocytes growth inactivating glucocorticoid receptor. **Eur. J. Pharmacol.**, v.721, n.1-3, p.301-304, dez. 2013.
- ROGERS, M. J.; CROCKETT, J. C.; COXON, F. P.; MONKKONEN, J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Bone**, v.49, n.1, p.34-41, jul. 2011.
- RUGGIERO, S. L.; DODSON, T. B. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws- 2014 Update. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.72, n.12, p.2381-2, dez. 2014.
- RUGGIERO, S. L.; DODSON, T. B.; ASSAEL, L. A.; LANDESBURG, R.; MARX, R. E.; MEHROTRA, B. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws--2009 update. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.67, n.5 Suppl, p.2-12, mai. 2009.
- RUSSELL, R. G. Bisphosphonates: the first 40 years. **Bone**, v.49, n.1, p.2-19, jul. 2011.
- SAITO, T.; IZUMI, K.; SHIOMI, A.; UENOYAMA, A.; OHNUKI, H.; KATO, H.; TERADA, M.; NOZAWA-INOUE, K.; KAWANO, Y.; TAKAGI, R.; MAEDA, T. Zoledronic acid impairs re-epithelialization through down-regulation of integrin α v β 6 and transforming growth factor β signalling in a three-dimensional in vitro wound healing model. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 43, n.3, p.373-80, mar. 2013.
- SARACINO, S.; CANUTO, R. A.; MAGGIORA, M.; ORALDI, M.; SCOLETTA, M.; CIUFFREDA, L.; VANDONE, A. M.; CAROSSA, S.; MOZZATI, M.; MUZIO, G. Exposing human epithelial cells to zoledronic acid can mediate osteonecrosis of jaw: an in vitro model. **J. Oral Pathol. Med.**, v.41, n.10, p.788-792, nov. 2012.
- SCHELLER, E. L.; BALDWIN, C. M.; KUO, S.; D'SILVA, N. J.; FEINBERG, S.E.; KREBSBACH, P. H.; EDWARDS, P. C. Bisphosphonates inhibit expression of p63 by oral keratinocytes. **J. Dent. Res.**, v.90, n.7, p.894-899, jul. 2011.
- SCHEPER, M.; CHAISUPARAT, R.; CULLEN, K.; MEILLER, T. A novel soft-tissue in vitro model for bisphosphonate-associated osteonecrosis. **FibroGenesis Tissue Repair**, v. 1, n.3, p.6, abr. 2010.

- SCHEPER, M. A.; BADROS, A.; CHAISUPARAT, R.; CULLEN, K. J.; MEILLER, T. F. Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. **Br. J. Haematol.**, 144(5):667-676. 2009a
- SCHEPER, M. A.; BADROS, A.; SALAMA, A. R.; WARBURTON, G.; CULLEN, K. J.; WEIKEL, D. S.; MEILLER, T. F. A novel bioassay model to determine clinically significant bisphosphonate levels. **Support. Care Cancer**, v.17, n.12, p.1553-1557, mar. 2009
- SENEL, F. C.; KADIOGLU DUMAN, M.; MUCI, E.; CANKAYA, M.; PAMPU, A. A.; ERSOZ, S.; GUNHAN, O. Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.109, n.3, p.385-391, mar. 2010.
- SIMON, M. J.; NIEHOFF, P.; KIMMIG, B.; WILTFANG, J.; ACIL, Y. Expression profile and synthesis of different collagen types I, II, III, and V of human gingival fibroblasts, osteoblasts, and SaOS-2 cells after bisphosphonate treatment. **Clin. Oral Investig.**, v.14, n.1, p.51-58, fev. 2010.
- VASCONCELOS, A. C.; BERTI-COUTO, S. A.; AZAMBUJA, A. A.; SALUM, F. G.; FIGUEIREDO, M. A.; DA SILVA, V. D.; CHERUBINI, K. Comparison of effects of clodronate and zoledronic acid on the repair of maxilla surgical wounds - histomorphometric, receptor activator of nuclear factor-kB ligand, osteoprotegerin, von Willebrand factor, and caspase-3 evaluation. **J. Oral Pathol. Med.**, v.41, n.9, p.702-712, oct. 2012.
- WALTER, C.; PABST, A.; ZIEBART, T.; KLEIN, M.; AL-NAWAS, B. Bisphosphonates affect migration ability and cell viability of HUVEC, fibroblasts and osteoblasts in vitro. **Oral Dis.**, v.17, n.2, p.194-199, març. 2011.
- WEITZMAN, R.; SAUTER, N.; ERIKSEN, E. F.; TARASSOFF, P. G.; LACERNA, L. V.; DIAS, R.; ALTMAYER, A.; CSERMAK-RENNER, K.; MCGRATH, L.; LANTWICKI, L.; HOHNEKER, J. A. Critical review: updated recommendations for the prevention, diagnosis, and treatment of osteonecrosis of the jaw in cancer patients--May 2006. **Crit. Ver. Oncol. Hematol.**, v.62, n.2. p.148-152, mai. 2007.
- YAMASHITA, J.; KOI, K.; YANG, D. Y.; MCCAULEY, L.K. Effect of zoledronate on oral wound healing in rats. **Clin. Cancer Res.**, v.17, n.6, p.1405-1414, mar. 2010.

Anexos

Aprovação da comissão de ética no uso de animais



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Efeito do zoledronato sobre o processo de reparo alveolar em ratos: estudo envolvendo os principais fatores de risco para o desenvolvimento de osteonecrose dos maxilares e avaliação de diferentes terapias preventivas" sob responsabilidade do Pesquisador **EDILSON ERVOLINO** e colaboração de Valdir Gouveia Garcia, Cláudio Aparecido Casatti, Leticia Helena Theodoro, Juliano Milanezi de Almeida, Maria José Hitomi Nagata, João Paulo Mardegan Issa, Rita Cássia Menegatti Domeles, Luan Felipe Toro, Thamires Priscila Cavazana, João Martins de Mello Neto e João Vicente Feres-Rodrigues está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo FOA-00581-2013.

CERTIFICATE

We certify that the research "Effect of zoledronate during the alveolar healing process in rats: study involving the major risk factors for developing osteonecrosis of the jaws and evaluation of different preventive therapies", process number FOA-00581-2013, under responsibility of **EDILSON ERVOLINO** and with collaboration of Valdir Gouveia Garcia, Cláudio Aparecido Casatti, Leticia Helena Theodoro, Juliano Milanezi de Almeida, Maria José Hitomi Nagata, João Paulo Mardegan Issa, Rita Cássia Menegatti Domeles, Luan Felipe Toro, Thamires Priscila Cavazana, João Martins de Mello Neto and João Vicente Feres-Rodrigues agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.

Profa. Dra. Mary Marcondes
 Vice-Coordenadora da CEUA
 CEUA Vice-Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
 Faculdade de Odontologia de Araçatuba
 Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
 Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
 Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br