

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Faculdade de Odontologia  
Câmpus de Araçatuba

**FLÁVIO DUARTE FARIA**

**Análise da microarquitetura e dinâmica da remodelação  
de ossos intramembranosos e endocondrais de ratos  
tratados com bifosfonato endovenoso**

Araçatuba – SP

2018

**FLÁVIO DUARTE FARIA**

**Análise da microarquitetura e dinâmica da remodelação  
de ossos intramembranosos e endocondrais de ratos  
tratados com bifosfonato endovenoso**

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.

Orientadora: Profa. Dra. Mariza Akemi Matsumoto

Araçatuba – SP

2018

Dedicatória

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu pai Max, por ser um exemplo para mim, tanto profissionalmente, como pessoa, por sempre estar comigo em todos os momentos, bons e ruins, me dando força para trilhar meu caminho.

À minha mãe Márcia, por ser uma guerreira, sempre cuidando da nossa família, fazendo de tudo para dar o melhor para mim, sempre agradando e alegrando a todos, sendo uma das minhas maiores inspirações.

Ao meu irmão Victor, meu melhor amigo e conselheiro, sem sombra de dúvidas uma das pessoas que mais aprendi nessa vida, mesmo longe, você sempre esteve presente e, com toda certeza, foi muito importante para minha formação.

Ao meu Tio Marco, uma pessoa que sempre me incentivou e me apoiou, em todas as escolhas que fiz, me deu total suporte, desde o início de minha graduação, obrigado por tudo.

Agradecimentos

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Prof. Dra. Mariza Akemi Matsumoto, por todo conhecimento, por todas as oportunidades, pela paciência e por nunca ter desistido de mim. Obrigado por todo suporte e disponibilidade, e por toda ajuda que me deu desde o segundo ano da graduação, sou muito grato por tudo.

À minha família em Jaboticabal e Araras, por todo suporte e amparo que me deram nesses cinco anos e em toda vida, em especial minha avó Sheila e avó Sônia, por todo carinho dedicado a mim.

Aos meus avós Max e Henrique, por todos ensinamentos sobre a vida, que infelizmente não estão mais aqui para compartilhar desde momento, mas os levo comigo para o resto da vida.

À Raíssa Schwam, minha namorada, pelo apoio, carinho e companheirismo que me fortaleceram para enfrentar as dificuldades.

À Prof. Dra. Roberta Okamoto e ao Prof. Dr. Leonardo Faverani, que sempre estiveram dispostos a me ajudar em todos os momentos que eu precisei.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela oportunidade de realização do curso de graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de iniciação científica, indispensável para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Wilson Roberto Poi, por ter me apresentado a faculdade e o curso de odontologia que possibilitaram as escolhas que me trouxeram até aqui.

A todos do Departamento de Ciências Básicas que me ajudaram de alguma forma.

Aos meus amigos Arthur Lacerda, Bianca Bernardes, Guilherme Pimenta, Henrique Abe, Lucas Marcondes, Sacha Rossi, Tiago Esgalha, Vinícius Orasmo E yugo Honda, por todos os momentos que tivemos durante esses cinco anos, vocês são parte da minha família agora.

Aos meus primos Guilherme e Bruno, por todo companheirismo e troca de experiências nesses cinco anos.

Aos meus amigos de infância Guilherme Lopes, Geraldo Papa Junior, Tais Papa e Leonardo Mascoli, que mesmo longe, sempre mantivemos contato, e uma ótima relação.

Aos meus amigos pós-graduandos Heitor Cecílio e Leonardo Raniel, por todos ensinamentos e momentos compartilhados, tanto dentro, quanto fora da faculdade.

A todos meus companheiros de Diretório Acadêmico, foram 3 anos de muito divertimento e aprendizado, sou muito grato a todos.

A todos meus colegas de sala que de alguma forma fizeram parte da minha formação, vou levar todos os momentos com vocês para toda vida.

Epígrafe

*“Não pretendemos que as coisas mudem, se sempre fazemos o mesmo. A crise é a melhor benção que pode ocorrer com as pessoas e países, porque a crise traz progressos. A criatividade nasce da angústia, como o dia nasce da noite escura. É na crise que nascem as invenções, os descobrimentos e as grandes estratégias. Quem supera a crise, supera a si mesmo sem ficar ‘superado’. Quem atribui à crise seus fracassos e penúrias, violenta seu próprio talento e respeita mais os problemas do que as soluções. A verdadeira crise é a crise da incompetência... Sem crise não há desafios; sem desafios, a vida é uma rotina, uma lenta agonia. Sem crise não há mérito. É na crise que se aflora o melhor de cada um...”*

*Albert Einstein*

## Sumário

## SUMÁRIO

	Página
Resumo .....	13
Abstract .....	15
1 Introdução e Revisão de Literatura .....	17
2 Objetivos.....	21
3 Materiais e Métodos .....	23
3.1 Delineamento Experimental .....	23
3.2 Análise morfológica tridimensional por MicroCT (CTvox) .....	23
3.3Preparo dos espécimes para análise em microscopia de escaneamento Confocal .....	24
3.4 Tratamento estatístico.....	24
4 Resultados .....	27
4.1 Análise morfológica tridimensional por MicroCT (CTvox) .....	27
4.2 Análise em microscopia de escaneamento Confocal .....	30
5 Discussão .....	33
6 Conclusão.....	37
7 Referências .....	39

Resumo

FARIA, FD. **Análise da microarquitetura e dinâmica da remodelação de ossos intramembranosos e endocondrais de ratos tratados com bifosfonato endovenoso.** 2018. N° 37. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

## RESUMO

A ampla e prolongada administração dos bifosfonatos nitrogenados para prevenção e tratamento de distúrbios de caráter osteolítico tem possibilitado a identificação de seus efeitos adversos em níveis sistêmicos e no esqueleto por meio de variadas metodologias. O presente estudo tem como objetivo analisar e comparar as características microarquiteturais de osso endocondral (fêmur) e ossos intramembranosos (maxila e mandíbula) e sua dinâmica de remodelação sob influência do ácido zoledrônico. Para tanto, 14 ratos albinos Wistar machos com 12 meses de idade, foram divididos em dois grupos de acordo com o tratamento recebido: Grupo Controle - 0,1 ml de soro fisiológico 0,9% via endovenosa (EV), e Grupo ZL - 0,035 ml/Kg de ácido zoledrônico via EV. Os animais de ambos os grupos foram tratados a cada 15 dias, sendo as substâncias administradas na veia caudal. Após a oitava aplicação das respectivas substâncias, todos os animais receberam injeção do fluorocromocalceína por via intramuscular (IM), na dose de 20 mg/Kg para cada animal. Após 10 dias da aplicação da calceína, foi administrado 20 mg/Kg do fluorocromo alizarina via IM. Após 10 dias da aplicação da alizarina, todos os animais foram submetidos à eutanásia para a remoção dos ossos maxila, mandíbula e fêmur os quais foram submetidos à análise por meio de microtomografia computadorizada (microCT) para avaliação da microarquitetura da matriz mineralizada trabecular considerando-se os parâmetros fração de volume ósseo (BV/TV), número de trabéculas (Tb.N), espessura das trabéculas (Tb.Th) e separação entre as trabéculas (Tb.Sp). Na análise do osso cortical foi considerada a média da espessura cortical (Ct.Th). Para avaliação da dinâmica da remodelação óssea as lâminas foram analisadas por meio de microscopia confocal. A partir dos dados obtidos, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os ossos analisados pelas análises do microCT. No entanto, a microscopia confocal revelou valores significativamente reduzidos na quantidade de tecido ósseo depositado no intervalo de 10 dias no fêmur C ( $311,9 \pm 46,76$ ) e ZL ( $122,5 \pm 28,11$ ) para o corante alizarina, e na mandíbula C ( $429,7 \pm 82,61$ ) e ZL ( $82,61 \pm 13,92$ ) para o corante calceína e C ( $680,4 \pm 19,78$ ) e ZL ( $317,0 \pm 39,63$ ) para a alizarina. Deste modo, concluiu-se que a administração intravenosa de ZL não alterou a microarquitetura óssea considerando-se a origem intramembranosa ou endocondral dos ossos. No entanto, o processo de remodelação tornou-se significativamente reduzido nos ossos mais corticalizados, fêmur e mandíbula, na presença do ZL.

**Palavras-chave:** Bifosfonato. Osso endocondral. Osso intramembranoso. Ratos.

Abstract

## ABSTRACT

Prolonged and wide administration of the bisphosphonates-containing nitrogen for prevention and treatment of osteolytic diseases have made possible the identification of the adverse effects they provoke at systemic level and in the skeleton by various methodologies. The aim of the present study was to analyze and to compare microarchitecture characteristics of intramembranous (maxillae and mandible) and endochondral (femur), as well as the remodeling dynamics under the influence of zoledronic acid (ZL). Fourteen male Wistar rats, age of 12 months, were distributed into two groups, according to the treatment: Control - 0.1 ml of intravenous (IV) 0.9% saline solution, and ZL - 0.035 ml/Kg of IV ZL. All animals of both groups were treated every 15 days, and the substances were administered in the tail vein. After the eighth administration of the substances, all the animals received intramuscular (IM) injection of the fluorochrome calcein, in the dose of 20 mg/Kg for each animal. After 10 days of calcein injection, 20 mg/Kg of fluorochrome of alizarin was administered, via IM. After 10 days of alizarin injections, all the animals were euthanized for the removal of the maxillae, mandible and femur to undergo micro-computed tomography scanning (microCT) for the analysis of the mineralized trabecular bone matrix, considering the following parameters: bone volume fraction (BV/TV), trabecular number (Tb.N), trabecular thickness (Tb.Th), and trabecular separation (Tb.Sp). For the analysis of cortical bone, average cortical thickness (Ct.Th) was considered. For the analysis of bone remodeling dynamics, histological slices were observed under confocal microscopy. From the obtained data, no statistically significant differences were detected among the analyzed bones under microCT scanning. However, confocal microscopy revealed a significant decrease in bone formation at the interval of 10 days in the femur C ( $311,9 \pm 46,76$ ) and ZL ( $122,5 \pm 28,11$ ) for alizarine, and in mandible C ( $429,7 \pm 82,61$ ) and ZL ( $82,61 \pm 13,92$ ) for calcein, and C ( $680,4 \pm 19,78$ ) and ZL ( $317,0 \pm 39,63$ ) for alizarine. In this way, it was concluded that intravenous administration of ZL did not change bone microarchitecture taking into account the intramembranous or endochondral origin of the bones. However, remodeling process was significantly reduced in the corticalized bones, femur and mandible, in the presence of ZL.

Key words: Bisphosphonate. Endochondral bone. Intramembranous bone. Rats.

## **Introdução e Revisão de Literatura**

## 1 Introdução e Revisão da Literatura

Há cerca de 40 anos, os bifosfonatos nitrogenados (BFs) tem sido utilizados para o tratamento de diversas doenças do metabolismo ósseo de caráter osteolítico (Graham, Russel, 2011), o que tem possibilitado a identificação e registro de seus variados efeitos adversos em nível sistêmico, como as alterações renais (Bounameaux et al., 1983) e gastrintestinais (Modi et al., 2015) e local, como na cavidade bucal (CoskunBenlidayi&Guzel, 2013).

O tipo de BF, bem como os protocolos e vias de administração variam de acordo com a patologia em questão, sendo selecionados de acordo com sua potência (Gutta, Louis, 2007). Usualmente, os BFs de uso oral como alendronato e risedronato são indicados para o tratamento de osteoporose e osteopenia (Iwamoto et al., 2006), enquanto que os injetáveis, pamidronato e zoledronato, são indicados para as neoplasias malignas e metástases ósseas (Lipton et al., 2002), sendo estes últimos os mais diretamente relacionados com o desenvolvimento de uma afecção bucal importante, a osteonecrose dos maxilares (Dodson, 2009).

Resultados de revisão sistemática realizados por Hadji (2011) a respeito especificamente do uso do ácido zoledrônico para o tratamento de osteoporose, de perda óssea devido a tratamento oncológico e de metástases ósseas, demonstraram que as posologias variam de acordo com evidências clínicas, observando-se uma relação direta entre o aumento das doses e a severidade da doença. Deste modo, para pacientes oncológicos indica-se a dose de 4mg a cada 3-4 semanas, o que potencializa a ação antirreabsortiva do BF, enquanto que para as demais condições as posologias variam de aplicações semestrais a anuais e até bianuais.

Embora o mecanismo de ação exato destes medicamentos ainda apresente pontos obscuros, o osteoclasto é um alvo certo, sofrendo alterações na organização de seu citoesqueleto pela inibição da via mevalonato, a qual regula a biossíntese de proteínas isoprenóides para modificação lipídica de GTPases, como a farnesildifosfato e a geranilgeranildifosfato (Rogers et al., 2011). Isto causa alterações em seu citoesqueleto e, conseqüentemente, impede a formação da borda corrugada, estrutura essencial para o processo de reabsorção e do tráfego vesicular, levando-o à

apoptose (Gutta& Louis, 2007). De modo contrário, o uso em curto prazo dos BFs apresenta efeito anti-apoptótico sobre os osteócitos e osteoblastos pela ativação da quinase ERK (Loiselle et al., 2013). Devido a estes eventos, o processo de remodelação do tecido ósseo é alterado, resultando em modificações na microarquitetura óssea e influenciando diretamente na capacidade mecânica do tecido.

Atualmente, relatos de fraturas femorais atípicas (FFA), associadas ao uso contínuo e a longo-prazo dos BFs, tem sido registrados (Geissler et al., 2015). Embora grande parte destes relatos esteja associada à administração dos BFs de uso oral (Schmidt et al., 2010; Lee et al., 2015), recentes casos de FFA associados aos BFs de administração endovenosa como o zoledronato e o pamidronado, também tem sido apresentados (Chang et al., 2012; Hayashi et al., 2014). Segundo a American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR), consideram-se FFA aquelas não traumáticas ou causadas por baixo impacto, localizadas na região subtrocantérica femoral e que radiograficamente apresentam-se como uma linha transversa ou oblíqua, tendo como ponto de origem a cortical lateral onde pode haver uma reação periosteal focal ou difusa (Shane et al., 2014). Esta reação pode ser explicada pelo fato da ação anti-apoptótica dos BFs sobre os osteócitos (Loiselle et al., 2013), os quais acabam morrendo por envelhecimento e por acúmulo de danos, e não são repostos pela deficiência da remodelação óssea decorrente da alteração osteoclástica, essencial para o reparo das microfraturas que ocorrem na cortical como um mecanismo para dissipação de energias (Mori et al., 1997).

Sabendo-se da importância dos osteócitos (Dallas et al., 2013), entende-se o ciclo vicioso que se forma. Estas células caracterizam-se por suas numerosas extensões citoplasmáticas que os conectam com outros osteócitos e células osteoblásticas, bem como vasos sanguíneos, possibilitando o controle de fluxo de cálcio e ativação celular. Sua morte por apoptose libera corpos apoptóticos que expressam RANKL, ativando osteoclastos (Kogiani et al., 2008). Pela sua ausência ou apoptose tardia pelo uso dos BFs, o processo de remodelação fica comprometido, as microfraturas permanecem e aumentam, podendo causar uma descontinuidade no perióstio levando à formação de um pequeno calo ósseo (Geissler et al., 2015). Além disso, como consequência, a matriz óssea se torna mais rígida e perde tenacidade, propriedades necessárias para a manutenção da capacidade biomecânica do tecido.

A baixa expectativa de vida e o tempo de tratamento reduzido dos pacientes oncológicos são fatores que provavelmente resultam na escassez de estudos controlados sobre as FFAs (Saad et al., 2012). Considerando-se estas dificuldades, os trabalhos experimentais com modelo animal auxiliam no entendimento da ação dos BFs em situações específicas, guardando-se as devidas diferenças entre as espécies. Yu et al. (2012) compararam o processo de reparo de fraturas mandibulares e tibiais de camundongos sob ação do ácido zoledrônico, a fim de observar o processo de reparo de ossos endocondrais e intramembranosos nestas condições. Constataram atraso na fase inicial do reparo das fraturas das tíbias pela análise do calo ósseo, e na fase final nas fraturas de mandíbula pela observação do processo de remodelação, relacionado à diminuição do número de osteoclastos pelo uso do BF. No entanto, cabe destacar o modelo de fraturas não-estabilizadas adotado no estudo.

Predominantemente, o uso de ratos como modelo animal para o estudo dos efeitos dos BFs no esqueleto como um todo, tem-se consolidado por pesquisas que avaliam a farmacocinética destas drogas nestes animais e sua biodisponibilidade em diferentes ossos (Lin et al., 1991; Weiss et al., 2008) o que validam este modelo experimental. Apesar das fortes evidências que associam as FFAs ao uso contínuo e prolongado dos BFs, faltam estudos a respeito das condições microarquiteturais de outros ossos longos e de ossos intramembranosos como a maxila e mandíbula.

## **Objetivos**

## 2 Objetivos

O presente projeto teve como objetivo analisar a influência do tratamento com ácido zoledrônico sob a microarquitetura e dinâmica da remodelação de ossos endocondrais (fêmur) e intramembranosos (maxila e mandíbula) em ratos. Detalhadamente, os objetivos específicos do projeto foram:

- a) quantificar parâmetros morfológicos microtomográficos da microarquitetura de ossos endocondrais (fêmur) e intramembranosos (maxila e mandíbula) frente ao tratamento com ácido zoledrônico em ratos;
- b) quantificar o índice de aposição óssea em ossos endocondrais (fêmur) e intramembranosos (maxila e mandíbula) frente ao tratamento com ácido zoledrônico em ratos.

## **Materiais e Métodos**

### 3 Materiais e Métodos

#### 3.1 Delineamento experimental

O projeto foi enviado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP, Processo FOA nº 2015-00209 (Anexo A). Foram utilizados ratos albinos Wistar machos, com 12 meses de idade, com peso médio de 500g, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP. Os animais foram colocados em gaiolas de polipropileno, forradas com maravalha branca de pinho trocada três vezes por semana, em número de 3 a 4 animais por caixa. Durante todo o período experimental, os animais permaneceram no biotério do Departamento de Ciências Básicas – Disciplinas de Histologia e Embriologia e Anatomia, sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e ciclo de luz de 12 horas claro/escuro e exaustão, recebendo água e ração sem restrição.

Os animais foram distribuídos em 2 grupos de 7 animais cada, como se segue: Grupo C – controle negativo: animais submetidos à administração de soro fisiológico; Grupo ZL – animais submetidos à administração de ácido zoledrônico (Zometa®, Novartis Pharma Stein AG, Stein, Suíça).

Os animais dos Grupos ZL foram tratados com o ácido zoledrônico administrado via EV na veia caudal na dose de 0,035 mg/Kg a cada duas semanas, de acordo com HOKUGO et al. (2010), continuando até o último período experimental. Após a 8ª aplicação, os animais receberam injeção defluorocromocalceína por via intramuscular (IM), na dosagem de 20mg/Kg para cada animal. Após 10 dias da aplicação da calceína, foi administrado 20mg/Kg defluorocromo alizarina IM.

Os pesos corpóreos dos animais foram aferidos semanalmente. Após 10 dias da aplicação do fluorocromo alizarina todos os animais foram submetidos à eutanásia para a remoção dos espécimes. As tíbias, maxilas e mandíbulas foram removidas com auxílio lâminas de bisturi nº 10 e tesouras, e imediatamente fixadas em formalina tamponada (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 10% por 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas e posteriormente imersos em álcool 70%.

### **3.2 Análise morfológica tridimensional por MicroCT (CTvox)**

Todos os ossos removidos foram escaneados em microCT (Skycan 1174v2, Bruker microCT, Kontich, Bélgica) utilizando-se os seguintes parâmetros tomográficos: 50kV, 800 uA, filtro de 0,5mm Al, 180 graus de rotação e intervalo de exposição de um grau, e as imagens capturadas com resolução de 1304x1024 pixels e tamanho de voxel de 19 µm. Após os escaneamentos, os espécimes seguiram para processamento para análise em microscopia de escaneamento Confocal. As imagens escaneadas foram reconstruídas no software NRecon v1.6.4.8 (SkyScan, Bruker microCT, Kontich, Bélgica) com parâmetros de reconstrução padronizados para cada tipo de osso.

Análise descritiva tridimensional: cortes microtomográficos foram renderizados no software CTvox 2.3 para obtenção de imagens tridimensionais em diferentes planos de secção (transaxial e sagital) e posterior análise interativa da morfologia óssea. Análise quantitativa de parâmetros morfológicos: os cortes microtomográficos foram realinhados no software Data Viewer 1.4.4.0 e posteriormente analisados no software CTAn em relação a parâmetros morfológicos relacionados a microarquitetura do tecido ósseo. Para análise da microarquitetura do osso trabecular foram considerados fração de volume ósseo (BV/TV), número de trabéculas (Tb.N), espessura das trabéculas (Tb.Th) e separação entre as trabéculas (Tb.Sp). Na análise do osso cortical foi considerada a média da espessura cortical (Ct.Th) (Brouxsein et al., 2010). Para todas as análises, tanto trabecular como cortical, foram delimitadas regiões de interesse (ROI) para cada tipo de osso: porção proximal do fêmur e corpo de mandíbula e maxila. Para a análise dos fêmures foram feitas análises nas porções cortical e trabecular, separadamente, sendo delimitado um ROI de 4,5 mm de diâmetro e 3 mm de profundidade na região central da diáfise e de 2 mm de diâmetro e 1,5 mm de profundidade na região do colo femoral. Para a maxila, delimitou-se um ROI de 1 mm de diâmetro e 1 mm de profundidade na região de apófise alveolar, imediatamente abaixo do alvéolo do incisivo central superior, e para a mandíbula, ROI de 1,5 mm de diâmetro e 1,5 mm de profundidade na região de apófise alveolar. Os parâmetros de análise para a região cortical do fêmur e trabecular de todos os ossos foram determinados de acordo com Brouxsein et al. (2010).

### **3.3 Preparo dos espécimes para análise em microscopia de escaneamento Confocal**

Os espécimes acondicionados em álcool 70% seguirão processo de desidratação utilizando-se sequência crescente de concentração de álcoois para serem infiltradas com resina acrílica auto polimerizante (Jet, Artigos Odontológicos Clássico Ltda, Campo Limpo Paulista, SP, Brasil). Após a polimerização da resina, os espécimes foram desgastados com brocas multilaminadas até alcançar o plano de confecção das lâminas. Os cortes longitudinais foram subsequentemente desgastados com lixas de diferentes gramaturas até alcançar a espessura de 100  $\mu\text{m}$ , e as lâminas montadas com lamínulas e os cortes estabilizados com óleo mineral. Os espécimes foram analisados em microscópio Leica CTR 400 CS SPE (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha), no aumento de 10x. As imagens obtidas foram reconstruídas para sobreposição dos dois fluorocromos, calceína e alizarina. Foi realizada a medição das áreas marcadas pelos dois fluorocromos, obtendo-se os valores da quantidade de tecido ósseo depositado nos dois momentos analisados utilizando-se o software Image ProPlus5.0 (Nikon, Toquio, Japão).

### **3.4 Tratamento estatístico**

Os dados quantitativos, obtidos pela análise em microCT e epifluorescência, foram submetidos ao teste de homocedasticidade e normalidade de Shapiro-Wilk, para verificar se apresentavam distribuição normal e, posteriormente, foram submetidos a teste não paramétrico de Mann-Whitney. Todos os testes foram executados no programa estatístico Sigmaplot 12.3 ExaktGraphsand Data Analysis (San Jose, CA, EUA).

## **Resultados**

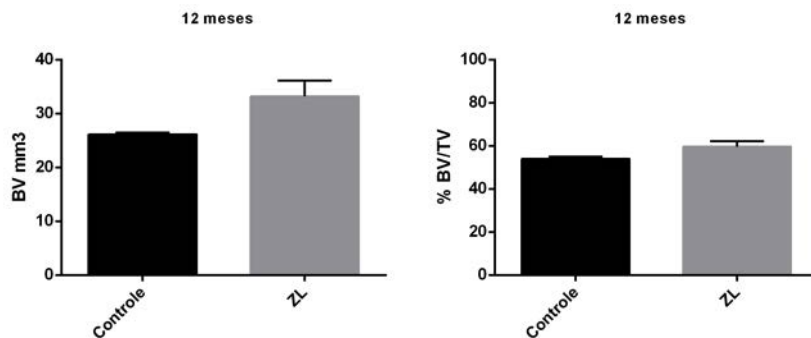
## 4 Resultados

### 4.1 Análise morfológica tridimensional por MicroCT (CTvox)

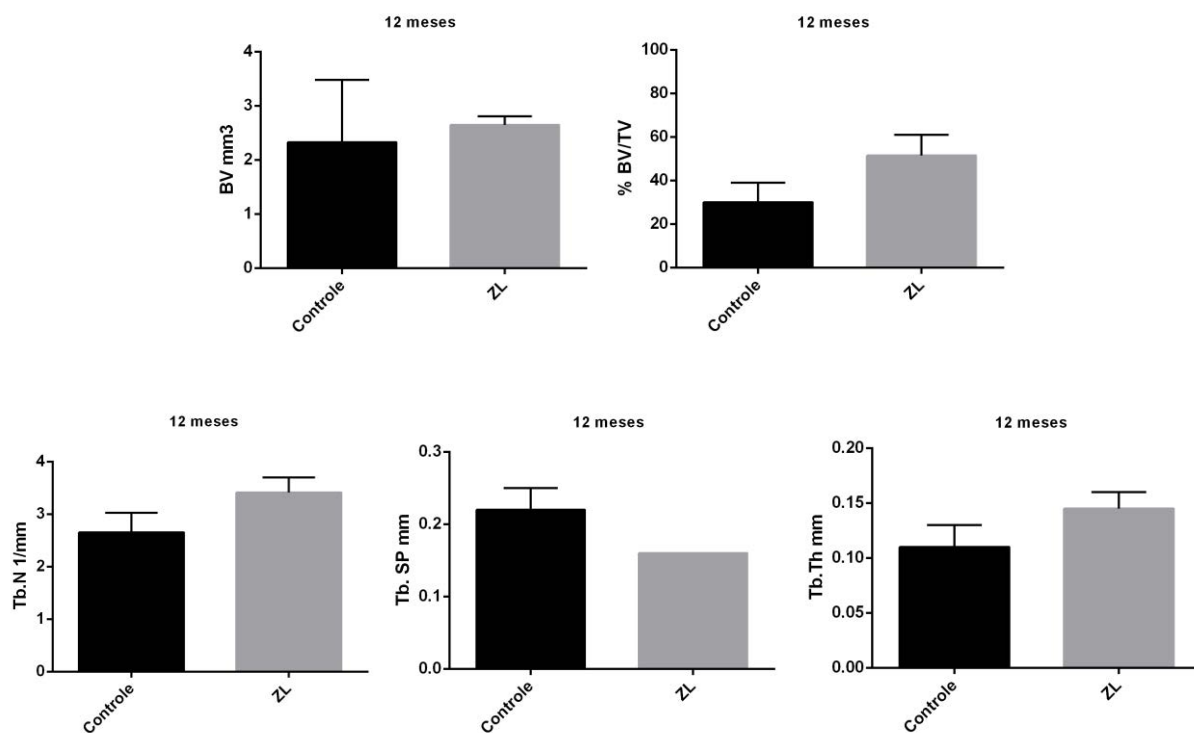
Não foram detectadas diferenças estatísticas significantes entre os grupos C e ZL, para os parâmetros analisados, conforme se observa na Tabela 1 e Figuras 1 a 4.

**Tabela 1** – Valores da média e desvio padrão (DP) dos parâmetros analisados da microarquitetura óssea trabecular dos fêmures, maxila e mandíbula.

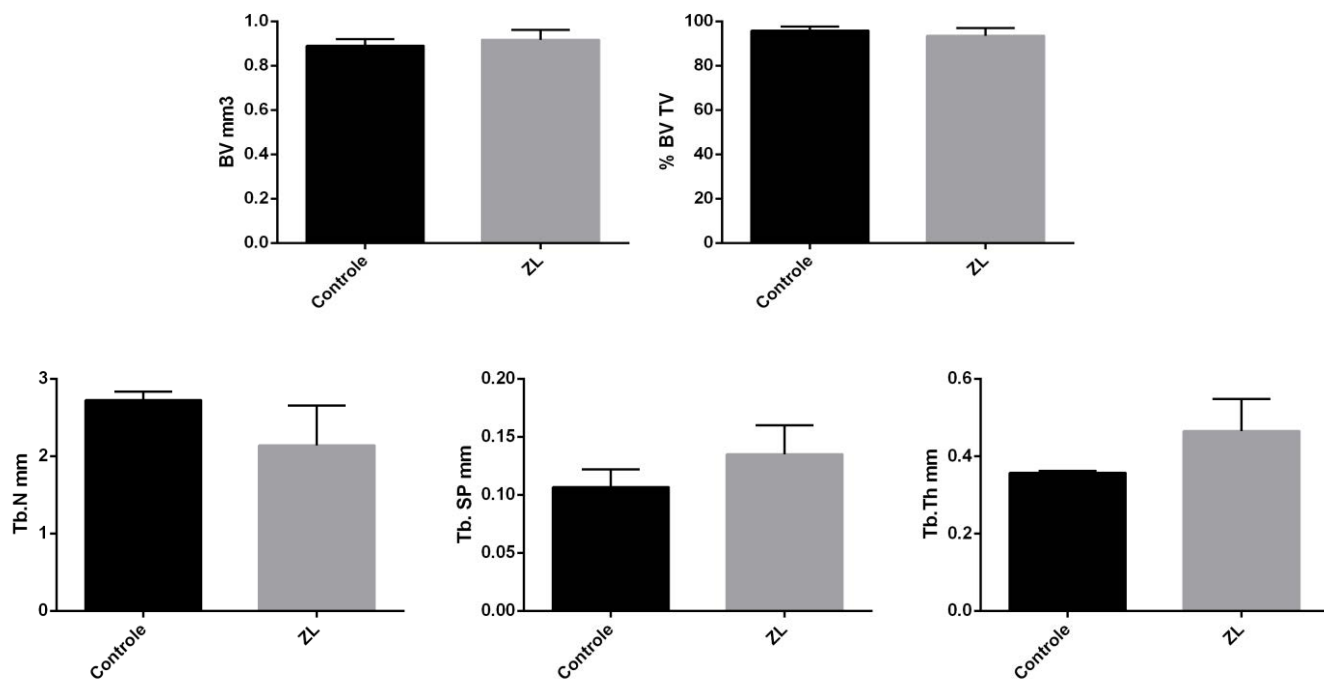
Osso	Parâmetro	Grupo C		Grupo ZL	
		Média	DP	Média	DP
Fêmur	BV mm <sup>3</sup>	2,327	1,155	2,645	0,1650
	BV/TV%	30,00	9,000	51,50	9,500
	Tb.Th (mm)	0,1100	0,0200	0,1450	0,0150
	Tb.SP (mm)	0,2200	0,0300	0,1600	0,0
	Tb.N (1/mm)	2,655	0,3750	3,415	0,2850
Maxila	BV mm <sup>3</sup>	0,8900	0,0300	0,9167	0,04509
	BV/TV%	95,86	1,865	94,67	3,215
	Tb.Th (mm)	0,2487	0,18842	0,5000	0,05568
	Tb.SP (mm)	0,1067	0,01528	0,1367	0,03055
	Tb.N (1/mm)	2,727	0,1069	2,277	0,5358
Mandíbula	BV mm <sup>3</sup>	1,485	0,1050	2,825	0,6050
	BV/TV%	67,03	5,610	90,74	3,265
	Tb.Th (mm)	0,3400	0,0500	0,4950	0,05500
	Tb.SP (mm)	0,2300	0,07000	0,1550	0,0150
	Tb.N (1/mm)	2,040	0,5000	1,851	0,1510



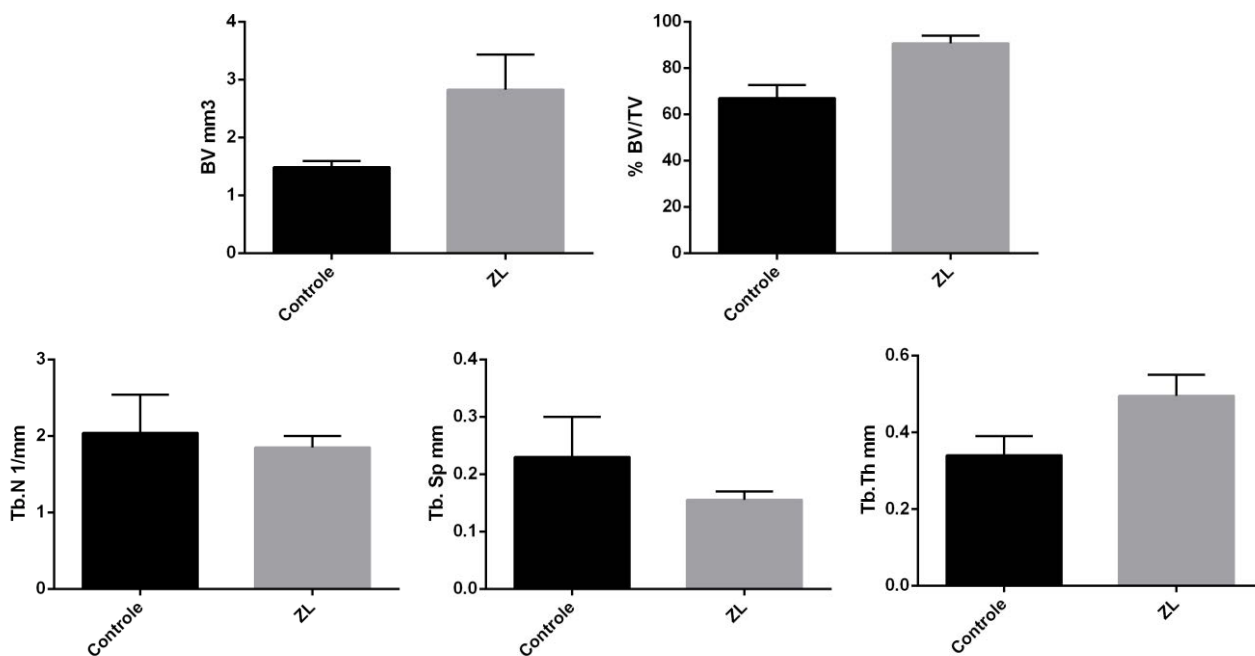
**Figura 1** –Fêmur – representação gráfica dos valores da média e desvio padrão do volume ósseo (BV mm<sup>3</sup>) e fração do volume ósseo (BV/TV %) da microarquitetura cortical óssea



**Figura 2** –Fêmur – representação gráfica dos valores da média e desvio padrão do volume ósseo (BV mm<sup>3</sup>), fração do volume ósseo (BV/TV %), número de trabéculas (Tb.N), espaçamento trabecular (Tb.SP) e espessura trabecular (Tb.Th) da microarquitetura trabecular óssea



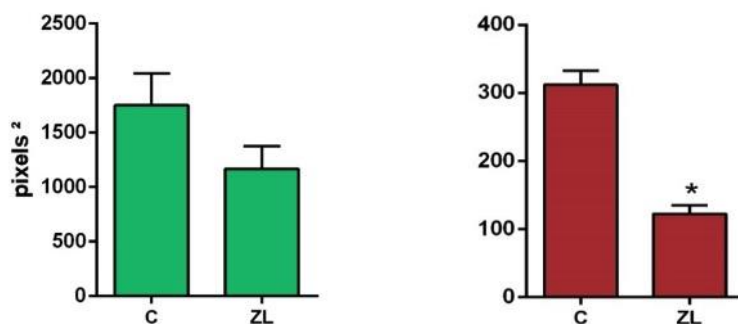
**Figura 3** –*Maxila* – representação gráfica dos valores da média e desvio padrão do volume ósseo (BV mm<sup>3</sup>), fração do volume ósseo (BV/TV %), número de trabéculas (Tb.N), espaçamento trabecular (Tb.SP) e espessura trabecular (Tb.Th) da microarquitetura trabecular óssea



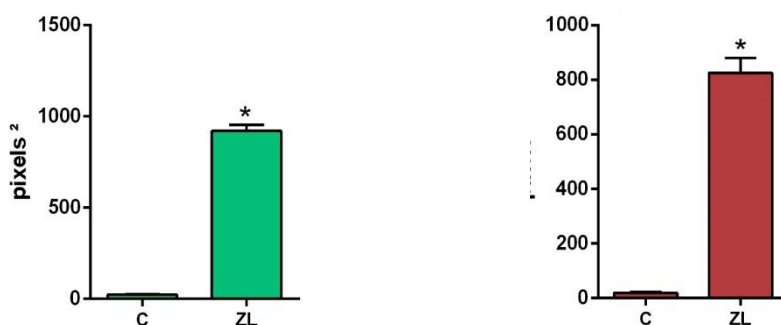
**Figura 4** –*Mandíbula* – representação gráfica dos valores da média e desvio padrão do volume ósseo (BV mm<sup>3</sup>), fração do volume ósseo (BV/TV %), número de trabéculas (Tb.N)espaçamento trabecular (Tb.SP) e espessura trabecular (Tb.Th) da microarquitetura trabecular óssea

#### 4.2 Análise em microscopia de escaneamento Confocal

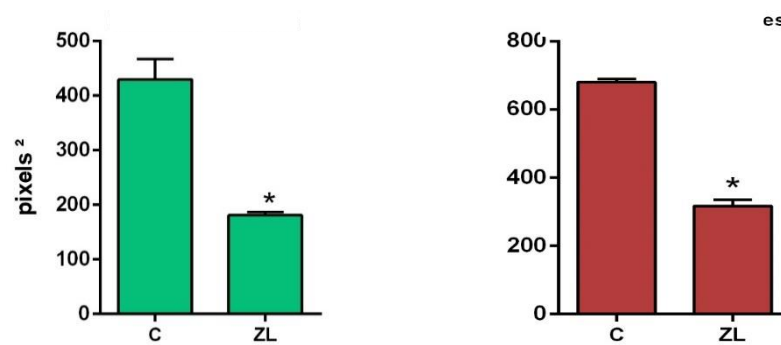
Considerando-se a quantidade de tecido ósseo depositado no osso fêmur, no primeiro momento marcado pelo corante calceína, não foi detectada diferença significativa entre os grupos C ( $1.752 \pm 655,8$ ) e ZL ( $1.167 \pm 472,9$ ), porém, na comparação do corante alizarina, detectou-se diferença entre os grupos ( $311,9 \pm 46,76$ ;  $122,5 \pm 28,11$ ), respectivamente. Na maxila, considerando-se a quantidade de tecido ósseo marcado pelo corante calceína, detectou-se diferença significativa ( $p = 0.004$ ) entre os grupos C ( $22,96 \pm 6,331$ ) e ZL ( $921,0 \pm 70,62$ ), bem como pelo corante alizarina ( $19,50 \pm 5,337$ ;  $824,8 \pm 123,4$ ), respectivamente. Do mesmo modo, na mandíbula detectou-se diferença significativa ( $p=0,004$ ) na deposição óssea entre os grupos C e ZL nos dois momentos de aplicação dos corantes, calceína ( $429,7 \pm 82,61$ ;  $82,61 \pm 13,92$ ) e alizarina ( $680,4 \pm 19,78$ ;  $317,0 \pm 39,64$ ) respectivamente, conforme observa-se nas Figuras 5 a 8.



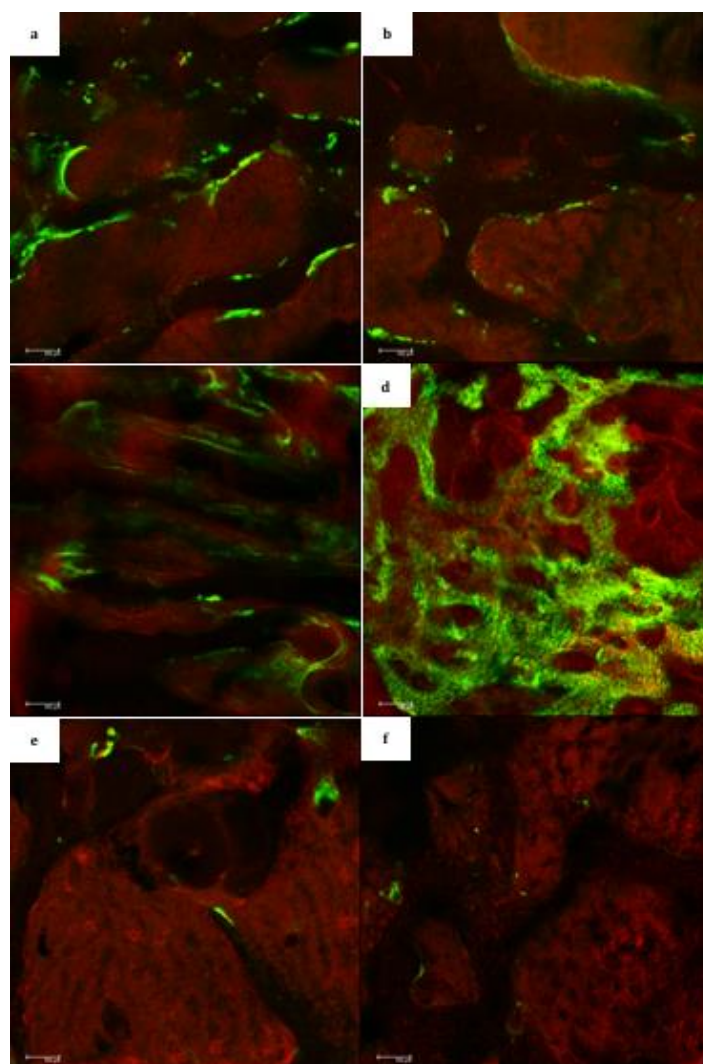
**Figura 5** – Valores obtidos a partir da mensuração das áreas marcadas pelos corantes calceína (verde) e alizarina (vermelho) no osso fêmur, comparando-se os grupos C e ZL.



**Figura 6** – Valores obtidos a partir da mensuração das áreas marcadas pelos corantes calceína (verde) e alizarina (vermelho) na maxila, comparando-se os grupos C e ZL.



**Figura 7** – Valores obtidos a partir da mensuração das áreas marcadas pelos corantes calceína (verde) e alizarina (vermelho) na mandíbula, comparando-se os grupos C e ZL.



**Figura 8** – Imagens obtidas a partir do escaneamento confocal, a) fêmur C, b) fêmur ZL, c) maxila C, d) maxila ZL, e) mandíbula C, f) mandíbula ZL.

## **Discussão**

## 5 Discussão

Informações relevantes têm sido obtidas com relação à ação dos BPs em ossos específicos do esqueleto, especialmente desenvolvidos em modelos animais (Vermeer et al., 2013; Vermeer et al., 2017). Tais evidências auxiliam no entendimento de dúvidas existentes com relação às diferentes respostas obtidas por diversos modelos experimentais de osteonecrose dos maxilares (Everts et al., 2009). Em 2013, Vermeer et al. revelaram diferenças na capacidade de internalização do BP risedronato por osteoclastos derivados de ossos longos e da mandíbula de camundongos C57BL/6J, demonstrando que, apesar de os osteoclastos das mandíbulas internalizarem mais a droga, os mesmos foram menos susceptíveis a ela do que os dos ossos longos, com menor interferência nos genes catepsina K e maior expressão de genes anti-apoptóticos como Bcl-xl e Bcl-2.

Além das diferentes respostas no modelo animal, pode-se observar o desenvolvimento de ONJ relacionados a essa classe de medicamento. No entanto, juntamente com esses problemas, o protocolo de administração do medicamento, dosagens e o tipo de BPs, interferem na resposta do organismo. Por isso no presente estudo reproduzimos o protocolo de administração de ZL relatado por Hokugo et al. Considerando o modelo animal, a dosagem de acordo com o metabolismo dos ratos, e principalmente pelo percentual de osteonecrose alcançada de 14,3% de animais tratados, o mais próximo da situação clínica que varia de 1-21%. Indicando que a distribuição sistêmica do medicamento pode ser coerente.

No presente estudo, pudemos observar discretas diferenças na ação do ácido zoledrônico em ossos da maxila e mandíbula e o osso fêmur. A partir das análises realizadas, pode-se verificar que o fêmur foi mais susceptível à ação do medicamento do que a maxila e mandíbula. Apesar da ausência de diferença significativa nos valores obtidos pela análise do microCT, notou-se uma melhora geral na qualidade do tecido deste osso especificamente, tanto na sua região cortical, quanto na trabecular, analisada na região de colo do fêmur. Entre os ossos intramembranosos, a mandíbula respondeu mais satisfatoriamente que a maxila, sendo que este último apresentou valores inferiores comparado à não utilização do medicamento.

A análise da dinâmica de remodelação óssea pela utilização dos fluorocromos mostrou um menor incremento de matriz óssea mineralizada no fêmur e mandíbula quando da utilização do BP, apresentando resultado contrário na maxila, onde a quantidade de deposição de matriz mineralizada aumentou significativamente em relação ao grupo C, indicando necessidade de revisão dos resultados, uma vez que não foi possível realizar o cálculo para MAR, devido ao padrão irregular de deposição da matriz mineralizada. Esta situação ocorreu tanto no grupo C como no ZL, possivelmente pela idade dos animais e acentuado pela administração do BP.

Na verdade, os fluorocromos revelaram a baixa taxa de rotatividade de fêmur e mandíbula pela marcação pontual e irregular. A proposta original foi para executar a taxa de aposição de mineralização (MAR), como recomendado por Dempster et al. No entanto, o padrão de rotulagem irregular (como citado anteriormente) não permitiu essa análise, e portanto decidimos calcular a área do osso recém formado. Embora ratos com 12 meses de idade não possam ser considerados animais senis, a idade é um parâmetro importante, tendo em conta que os ratos de laboratório vivem em torno de três anos. Revisando a literatura, observa-se que a maioria das investigações utiliza ratos entre 6 e 10 semanas de idade e que a falta desta informação é freqüente. Por mais que não pareça ser um ponto de preocupação para as pesquisas, acreditamos firmemente que pode interferir diretamente na dinâmica de distribuição e absorção. Recentemente, nosso grupo relatou os resultados de um novo modelo de indução de osteonecrose, na extração dos incisivos superiores de ratos, ao invés de molares. Em ambos, o animal escolhido de modelo foi o rato Wistar macho, e a diferença foi basicamente na idade dos animais. No primeiro os animais tinham 3 meses de idade (Curra et al., 2016), enquanto no segundo tinham 20 meses de idade (Matsumoto et al., 2017), que resultou em um resultado bastante diferente, onde os ratos idosos foram mais resistentes ao desenvolvimento osteonecrose.

Os resultados obtidos no presente estudo nos levam a pensar nas variáveis que um único modelo animal pode evidenciar, quando o efeito sistêmico de uma droga é investigado. Isso pode nos guiar para a conclusão de que as osteonecroses não são exclusivamente dependentes das condições do metabolismo do tecido ósseo ou da microarquitetura original sob efeito de terapias de BPs, exigindo investigações

adicionais sobre o papel de outras interações moleculares que possam estar envolvidas.

**Conclusão**

## **6 Conclusão**

Concluiu-se que o fêmur e a mandíbula sofrem maior ação pelo ácido zoledrônico que a maxila, onde podemos observar uma aparente melhora na qualidade do tecido mineralizado e diminuição da dinâmica de remodelação.

## Referências

## 7 Referências

1. Bounameaux HM, Schifferli J, Montani JP, Jung A, Chatelanat F. Renal failure associated with intravenous diphosphonates. *Lancet*. 1983 Feb 26;1(8322):471.
2. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010 Jul;25(7):1468-86.
3. Chang ST, Tenforde AS, Grimsrud CD, O'Ryan FS, Gonzalez JR, Baer DM, Chandra M, Lo JC. Atypical femur fractures among breast cancer and multiple myeloma patients receiving intravenous bisphosphonate therapy. *Bone*. 2012 Sep;51(3):524-7.
4. CoskunBenlidayi I, Guzel R. ISRN Rheumatol. Oral bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw: a challenging adverse effect. 2013 May 16;2013:215034.
5. Curra C, Cardoso CL, Ferreira O Júnior, Curi MM, Matsumoto MA, Cavenago BC, Santos PL, Santiago JF Júnior. Medication-related osteonecrosis of the jaw. Introduction of a new modified experimental model. *Acta Cir Bras*. 2016 May;31(5):308-13.
6. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocr Rev*. 2013 Oct;34(5):658-90.
7. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 2013 Jan;28(1):2-17.
8. Dodson TB. Intravenous bisphosphonate therapy and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009 May;67(5 Suppl):44-52.
9. Geissler JR, Bajaj D, Fritton JC. American Society of Biomechanics Journal of Biomechanics Award 2013: Cortical bone tissue mechanical quality and biological mechanisms possibly underlying atypical fractures. *J Biomech*. 2015 Apr 13;48(6):883-894. doi: 10.1016/j.jbiomech.2015.01.032. Epub 2015 Feb 2.

10. Gutta R, Louis PJ. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws: science and rationale. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Aug;104(2):186-93.
11. Hadji P. Managing bone health with zoledronic acid: a review of randomized clinical study results. *Climateric*. 2011 June;14(3):321-332.
12. Hayashi K, Aono M, Shintani K, Kazuki K. Bisphosphonate-related atypical femoral fracture with bone metastasis of breast cancer: case report and review. *Anticancer Res*. 2014 Mar;34(3):1245-9.
13. Hokugo A, Christensen R, Chung EM, Sung EC, Felsenfeld AL, Sayre JW, Garrett N, Adams JS, Nishimura I (2010) Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with vitamin D deficiency in rats. *J Bone Miner Res* 25:1337-1349
14. Iwamoto J, Takeda T, Sato Y. Efficacy and safety of alendronate and risedronate for postmenopausal osteoporosis. *Curr Med Res Opin*. 2006 May;22(5):919-28.
15. Kogianni G, Mann V, Noble BS. Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction. *J Bone Miner Res*. 2008;23:915–927.
16. Lee S, Yin RV, Hirpara H, Lee NC, Lee A, Llanos S et al. Increased risk for atypical fractures associated with bisphosphonate use. *Fam Pract*. 2015 Apr 5. pii: cmu088. [Epub ahead of print]
17. Lin JH, Duggan DE, Chen IW, Ellsworth RL. Physiological disposition of alendronate, a potent anti-osteolytic bisphosphonate, in laboratory animals. *Drug Metab Dispos*. 1991 Sep-Oct;19(5):926-32.
18. Lipton A, Small E, Saad F, Gleason D, Gordon D, Smith M et al. The new bisphosphonate, Zometa (zoledronic acid), decreases skeletal complications in both osteolytic and osteoblastic lesions: a comparison to pamidronate. *Cancer Invest*. 2002;20 Suppl 2:45-54.
19. Loisel AE, Jiang JX, Donahue HJ. Gap junction and hemichannel functions in osteocytes. *Bone*. 2013 Jun;54(2):205-12.
20. Matsumoto MA, de Abreu Furquim EM, Gonçalves A, Santiago-Júnior JF, Saraiva PP, Cardoso CL, Munerato MS, Okamoto R. Aged rats under zoledronic acid therapy and oral surgery. *J Craniomaxillofac Surg*. 2017 May;45(5):781-787

21. Modi A, Siris ES, Steve Fan CP, Sajjan S. Gastrointestinal Events Among Patients Initiating Osteoporosis Therapy: A Retrospective Administrative Claims Database Analysis. *ClinTher*. 2015 Apr 9. pii: S0149-2918(15)00160-5. doi: 10.1016/j.clinthera.2015.03.018.
22. Mori S, Harruff R, Ambrosius W, Burr DB. Trabecular bone volume and microdamage accumulation in the femoral heads of women with and without femoral neck fractures. *Bone*. 1997 Dec;21(6):521-6.
23. Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Mönkkönen J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone*. 2011 Jul;49(1):34-41.
24. Russel RG. Bisphosphonates: The first 40 years. *Bone*. 2011 Jul;49(1):2-19.
25. Saad F, Brown JE, Van Poznak C, Ibrahim T, Stemmer, SM, Stopeck, AT et al. Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. *Ann Oncol*. 2012 May;23(5):1341–1347.
26. Schmidt GA, Horner KE, McDanel DL, Ross MB, Moores KG. Risks and benefits of long-term bisphosphonate therapy. *Am J Health Syst Pharm*. 2010 Jun 15;67(12):994-1001.
27. Shane E, Burr D, Abrahamsen B, Adler RA, Brown TD, Cheung AM et al. Atypical subtrochanteric and diaphyseal femoral fractures: second report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res*. 2014 Jan;29(1):1-23.
28. Weiss HM, Pfaar U, Schweitzer A, Wiegand H, Skerjanec A, Schran H. Biodistribution and plasma protein binding of zoledronic acid. *Drug Metab Dispos*. 2008 Oct;36(10):2043-9.
29. Yu YY, Lieu S, Hu D, Miclau T, Colnot C. Site specific effects of zoledronic acid during tibial and mandibular fracture repair. *PLoS One*. 2012;7(2):e31771.



# ANEXOS

## Anexo A



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**



CAMPUS ARAÇATUBA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Estudo do reparo alveolar e metabolismo ósseo de ratos submetidos à administração crônica de biofosfato nitrogenado endovenoso: análises microscópica, imunoistoquímica, biomecânica e por epifluorescência"**, Processo FOA nº 2015-00209, sob responsabilidade de Mariza Akemi Matsumoto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 25 de março de 2015.

**VALIDADE DESTES CERTIFICADO:** 01 de Março de 2017.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 01 de Abril de 2017.

### CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Study on dental socket repair and bone metabolism of rats under chronic administration on intravenous nitrogen-containing bisphosphonate: microscopic, immunohistochemical, biomechanical, and epifluorescence analysis"**, Protocol FOA nº 2015-00209, under the supervision of Mariza Akemi Matsumoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on March 25, 2015.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** March 01, 2017.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** April 01, 2017.