

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA  
CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCO-MAXILO-FACIAIS

**VIVIANE NEVES PACHECO**

***TERAPIA POR BISFOSFONATO NITROGENADO: AVALIAÇÃO EM RATOS DA  
ESTRUTURA ALVEOLAR***

*Linha de Pesquisa*

**Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia**

**Porto Alegre**

**2013**

## CIP - Catalogação na Publicação

Neves Pacheco, Viviane  
TERAPIA POR BISFOSFONATO NITROGENADO: AVALIAÇÃO  
EM RATOS DA ESTRUTURA ALVEOLAR / Viviane Neves  
Pacheco. -- 2013.  
90 f.

Orientadora: Deise Ponzoni.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia,  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto  
Alegre, BR-RS, 2013.

1. Osteonecrose da arcada ósseo-dentária por  
bisfosfonatos. 2. Bisfosfonatos. 3. Ácido  
Zoledrônico. I. Ponzoni, Deise, orient. II. Título.

**VIVIANE NEVES PACHECO**

***TERAPIA POR BISFOSFONATO NITROGENADO: AVALIAÇÃO EM RATOS DA  
ESTRUTURA ALVEOLAR***

*Linha de Pesquisa*

**Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Concentração Clínica Odontológica / Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilo-faciais.

**Orientadora:** Profa. Dra. Deise Ponzoni

**Porto Alegre**

**2013**

**VIVIANE NEVES PACHECO**

***TERAPIA POR BISFOSFONATO NITROGENADO: AVALIAÇÃO EM RATOS DA  
ESTRUTURA ALVEOLAR***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Concentração Clínica Odontológica / Cirurgia e Traumatologia Bucodentofacial.

Orientadora: Profa. Dra. Deise Ponzoni

Examinado em ..... de .....de 2013

**Banca Examinadora**

---

Profa. Adriana Etges  
Doutora em Patologia Bucal

---

Profa. Anna Christina Medeiros Fossati  
Doutora em Ciências (Biologia Celular e Tecidual)

---

Profa. Edela Puricelli  
Doutora em Odontologia/CTBMF

**Porto Alegre**

**2013**

*A minha mãe **LEONILDA**, por ser uma mulher de coragem e grande bondade, por me incentivar em todos os momentos da minha vida e me fazer sonhar mais alto. E ao meu noivo **JOSUÉ** pelo apoio incondicional na minha carreira, por ser um exemplo de homem e profissional, por estar ao meu lado sempre e tornar meus dias mais felizes.*

**A VOCÊS DEDICO ESTE TRABALHO.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **DEUS** por guiar meu caminho e me proporcionar saúde para lutar;

Ao meu pai **SILVIO** (*In Memoriam*) por ter sido um pai carinhoso e por continuar sendo uma lembrança constante como um incentivo na busca dos meus objetivos;

A minha orientadora **Profa. Dra. DEISE PONZONI** por ser um exemplo de dedicação ao ensino superior desse país, pela seriedade, ética, competência e comprometimento, por ter contribuído expressivamente para minha formação profissional;

A **Profa. Dra. EDELA PURICELLI** por ser um exemplo de profissional, pela luta do reconhecimento da Odontologia, por ter acreditado no meu potencial tanto na idealização desse trabalho como na minha formação acadêmica, por todo o ensinamento transmitido ao longo desses anos;

As minhas irmãs **JOSIANE E JANAÍNA** pelo carinho e amizade, por compreenderem minha ausência em alguns momentos;

Aos meus **FAMILIARES** que sempre me apoiaram na construção de minha trajetória profissional;

Ao meu colega **JULES RENAN DUTRA BEMFICA** pela amizade e companheirismo durante esses oito anos de formação, sem você certamente este mestrado não teria sido o mesmo, agradeço pela força nos momentos difíceis, pelos conselhos nos momentos de animosidade e principalmente pela alegria do dia-a-dia,

Aos Professores **Prof. Dr. ANGELO FREDDO, Prof. Dr. CARLOS EDUARDO BARALDI e Prof. Dr. MARCEL FASOLO DE PARIS**, pelo aprendizado passado durante o curso, pelos momentos de descontração e pela confiança depositada;

Aos colegas de mestrado **FERNANDO VACILOTTO GOMES e FABRÍCIO POLETTI MASSOTTI** pelos bons momentos de convivência durante o período d

mestrado;

A **Profa. Dra. ANNA CHRISTINA MEDEIROS FOSSATI** pelo apoio para com esse trabalho, pelo interesse e empenho no ensino superior;

As professoras **Profa. Dra. HELENA WILLHELM DE OLIVEIRA**, **Profa. Dra. NÁDIA ARUS** e a **FÍSICA GEISA MEDEIROS** pela atenção dedicada e disponibilidade ao longo da execução da análise tomográfica desse trabalho;

A **Profa. Dra. ADRIANA ETGES** por sua grande disponibilidade e empenho para realização das análises histológicas desse estudo;

Aos especializandos do curso de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-faciais da UFRGS, **JULIANE DE QUADROS DE BORTOLLI**, **ESTEVAN MARÇAL DA SILVEIRA STEGUES**, **BERNARDO OTTONI BRAGA BARREIRO**, **THALES BOTOMÉ COUSEN**, por serem grandes incentivadores do meu trabalho, pela grande amizade construída e tão logo sedimentada, pelos bons momentos de convivência;

As alunas de iniciação científica **ALESSANDRA JUNGES** e **ANA PAULA PADILHA** pelo apoio nas fases de execução do projeto e pela companhia agradável;

À **UNIDADE DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL (UEA)** do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, especialmente a **VETERINÁRIA FABÍOLA SCHONS MEYER** e à **ENFERMEIRA MARTA JUSTINA GIOTTI CIOTA** pelo carinho, dedicação e pela disposição incondicional com a qual conduzem essa Unidade, pela amizade e confiança a mim depositadas e apoio em todas as fases desse trabalho. Faço aqui menção também aos funcionários da UEA **Sra. ROSALINA BRAGA** e **Sr. EDUARDO MOTTOLA AMARO DA SILVEIRA** pelo auxílio e amizade;

À **UNIDADE DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL** do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e a **Profa. Dra. LUISE MEUER** pelo apoio durante a análise histológica experimento, e a Técnica em Patologia **FLÁVIA REJANE GIUSTI** pelo valor e empenho na confecção das lâminas histológicas e pela alegria contagiante;

Aos **FUNCIONÁRIOS DA ZONA 18** pela receptividade e pela ajuda prestada ao desenvolvimento das atividades assistenciais;

Aos **ALUNOS DE GRADUAÇÃO** pela receptividade e carinho, por permitirem que transferisse o que sei e aprendesse com o que ensinei.

À **UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (UFRGS)** e a **FACULDADE DE ODONTOLOGIA** por proporcionarem a minha formação profissional e estimularem a pesquisa, ensino e assistência na área da saúde;

A **CAPES** pela concessão de bolsa que me proporcionou a oportunidade de dedicar-me exclusivamente as atividades de mestrado durante estes dois anos;

A todos que de alguma maneira contribuíram para realização desse trabalho...

Meu muito Obrigada.



*“Se soubesse que o mundo se desintegraria amanhã, ainda assim plantaria a minha macieira. O que me assusta não é a violência de poucos, mas a omissão de muitos. Temos aprendido a voar como os pássaros, a nadar como os peixes, mas não aprendemos a sensível arte de viver como irmãos.”*

*Martin Luther King*

## RESUMO

**Introdução:** A osteonecrose da arcada ósseo-dentária associada à bisfosfonatos tem se tornado um importante efeito adverso associado ao complexo maxilo-mandibular. Os reais eventos que permeiam o desenvolvimento dessa condição permanecem indeterminados. **Objetivo:** O presente estudo propõe-se a analisar os efeitos do uso dessa medicação no tecido ósseo alveolar, bem como o desenvolvimento de um modelo de estudo reprodutível utilizando o Ácido Zoledrônico como medicação indutora diante da ausência de doença metabólica. **Metodologia:** A amostra foi composta por 42 ratos *wistar*, com 60 dias e peso médio de 250g. Os animais foram divididos em seis grupos (GI, GII, GIII, GIV, GV, GVI), diferindo quanto à administração da medicação; extensão da terapia; realização de extração dentária do primeiro molar superior esquerdo e defeito com broca na coroa dentária do primeiro molar inferior esquerdo. Os animais dos grupos GII e GIV receberam dose de 0,2mg/kg de Ácido Zoledrônico, semanalmente, por via intraperitoneal, por três semanas. O grupo GVI recebeu prolongamento da duração da terapia totalizando oito semanas. Os animais pertencentes aos grupos GI; GIII e GV receberam doses equivalentes de soro fisiológico. Os grupos GIII, GIV, GV, GVI foram submetidos a procedimentos para extração dentária no primeiro molar superior esquerdo e defeito com broca na coroa dentária do primeiro molar inferior esquerdo, na terceira semana após o início do experimento. Ao término de oito semanas todos os animais foram mortos através de câmara de CO<sup>2</sup> e realizou-se a necropsia e remoção das mandíbulas e maxilas para análise. Os dados foram avaliados por tomografia computadorizada de feixe cônico quanto aos níveis de cinza da imagem e por análise histológica, por meio da atribuição de escores quanto à presença de infiltrado inflamatório, tipo de infiltrado, vascularização, necrose óssea e reabsorção dentinária. **Resultados:** A comparação entre os grupos GI e GII quanto às avaliações dos níveis de cinza e densidade óssea, não foram estatisticamente significantes ( $p>0,05$ ). Houve diferença significativa quanto aos níveis de cinza na comparação entre os grupos GV e GVI em maxila e entre GIII e GIV em mandíbula ( $p<0,05$ ). A avaliação histológica mostrou presença de necrose óssea no grupo GVI e menor presença de remodelamento ósseo nos grupos teste (GIV e GVI) comparado aos controles (GIII e GV). A avaliação por escores não demonstrou associação entre nenhuma das variáveis com os grupos ( $p>0,05$ ). **Conclusão:** O Ácido Zoledrônico, isoladamente, retardou o reparo ósseo alveolar após extração dentária, no grupo que realizou terapia continuada por oito semanas (GVI) em comparação ao grupo

controle (GV), com diminuição dos níveis de cinza. Além disso, a medicação foi capaz de diminuir a capacidade reacional dos tecidos de suporte dentário, apresentando níveis de cinza mais elevados no grupo teste (GIV) quando comparado ao grupo controle (GIII). Alterações histológicas do padrão de normalidade foram observadas nos ossos maxilares dos grupos teste (GIV e GVI). Portanto, este modelo experimental foi capaz de desenvolver alterações no tecido ósseo alveolar de ratos por meio de terapia por Ácido Zoledrônico.

**Palavras-chave:** Osteonecrose da arcada ósseo-dentária por bisfosfonatos, Bisfosfonatos, Ácido Zoledrônico.

## ABSTRACT

**Introduction:** Osteonecrosis of the Jaw associated with bisphosphonates has become an important adverse effect associated with the maxillo-mandibular complex. The actual events that underlie the development of this condition remain undetermined. **Objective:** This study aims to analyze the effects of this medication in the alveolar bone, and the development of a reproducible model study using the Zoledronic acid only absence of metabolic disease. **Methods:** The sample consisted of 42 Wistar rats, 60 days and an average weight of 250g. The animals were divided into six groups (GI, GII, GIII, GIV, GV, GVI), differing in medication administration; extension of therapy; performing dental extraction of the maxillary left first molar and defect to drill in the first lower left molar in the dental crown. The animals of GII and GIV received a dose of 0.2 mg / kg of Zoledronic Acid, weekly, intraperitoneally, for three weeks. The group received GVI prolonged duration of therapy totaling eight weeks. The animals in groups GI, GII and GV received equivalent doses of saline. The GIII, GIV, GV, GVI underwent procedures for tooth extraction in left upper first molar and drill defect in the crown of the first molar tooth left in the third week after the start of the experiment. At the end of eight weeks all animals were killed by CO<sub>2</sub> chamber, performed necropsy and removal of mandibles and jaws for analysis. Data were evaluated by cone beam computed tomography as the gray level image and histological analysis, by assigning scores for the presence of inflammatory infiltrate, type of infiltration, vascularization, bone necrosis and resorption dentine. **Results:** The comparison between GI and GII as the evaluations of gray levels and bone density were not statistically significant ( $p > 0,05$ ). There was significant difference in the levels of gray in the comparison between groups GV and GVI in maxilla and in GIII and GIV ( $p < 0,05$ ) in mandible. Histological evaluation showed the presence of bone necrosis in group GVI and lower presence of bone remodeling in the test groups (GIV and GVI) compared to controls (GIII and GV). The evaluation scores showed no association between any of the variables with the groups ( $p > 0,05$ ). **Conclusion:** Zoledronic acid alone, delayed alveolar bone healing after tooth extraction in the group that underwent therapy continued for eight weeks (GVI) compared to the control group (GV), with decreased levels of gray. In addition, the drug was able to reduce the tissues of tooth support capacity reaction, with gray levels higher in the test group (GIV) when compared to the control group (GIII). Histological changes in the normal

pattern were observed in the jaws of the test groups (GIV and GVI). Therefore, this experimental model was able to develop alterations in alveolar bone of rats by means of zoledronic acid therapy.

**Keywords:** Osteonecrosis of the Jaw associated with bisphosphonates, Bisphosphonates, Zoledronic Acid.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 01: Tabela referente ao potencial inibidor da síntese da FPP dos bisfosfonatos nitrogenados. ....	26
Quadro 02: Distribuição dos grupos e variáveis. ....	36
Quadro 04: Linha do tempo do estudo, indicando abaixo o período em semanas. ....	36
Figura 01: Fórmula química do Ácido Zoledrônico.....	27
Figura 02: Desenho representativo referente à mandíbula do paciente após necropsia. ....	29
Figura 03: Ácido Zoledrônico.....	37
Figura 04: Imagem do momento de realização da etapa cirúrgica de sindesmotomia na região palatina do primeiro molar superior esquerdo. ....	39
Figura 05: a) Primeiro molar superior esquerdo íntegro. (←) b) Alvéolo dentário após extração do primeiro molar superior esquerdo (←).....	40
Figura 06: Simulação do posicionamento da broca esférica sobre a coroa dentária do primeiro molar inferior esquerdo em crânio seco. Observam-se as dimensões da broca em relação ao dente. ....	41
Figura 07: a) Primeiro molar inferior esquerdo íntegro (←). b) Defeito provocado pela aplicação da broca sobre a coroa do primeiro molar inferior esquerdo (←).....	42
Figura 08: Secção de hemicrânio esquerdo após necropsia. ....	43
Figura 09: Padronização do posicionamento para aquisição das imagens tomográficas. ....	44
Figura 10: a) Imagem tomográfica de corte sagital selecionado para visualização da área de análise da maxila, de um animal pertencente ao GI, visualização reduzida referente a 75% do tamanho natural. b) Em amarelo a delimitação da ROI para a maxila referente aos grupos GI e GII, em azul escala e localização do aumento em relação à imagem inicial, visualização aumentada referente a 200% do tamanho real. ....	46
Figura 11: a) Imagem tomográfica de corte sagital selecionado para visualização da área de análise da mandíbula, de um animal pertencente ao GI, visualização reduzida referente a 75% do tamanho natural. b) Em amarelo a delimitação da ROI para mandíbula, em azul escala e localização do aumento em relação à imagem inicial, visualização aumentada referente a 200% do tamanho real. ....	46
Figura 12: Imagem histológica da região apical distal do primeiro molar inferior esquerdo (GII) HE, 200x. a) Região de interesse delimitada pela área tracejada em azul. ....	48
Figura 13: Área selecionada transferida para novo plano. ....	48
Figura 14: Seleção do tecido mineralizado com a ferramenta <i>magic tool</i> . ....	49
Figura 15: Área selecionada de tecido mineralizado.....	49

Figura 16: Imagens histológicas de ápices radiculares referenciando a escala de escores para infiltrado inflamatório; a) Ausência de infiltrado inflamatório (→); b) Leve infiltrado Inflamatório (→); c) Moderado infiltrado inflamatório (→); d) Intenso Infiltrado Inflamatório (→). HE, 200x. ....	51
Figura 17: Vista aproximada do primeiro molar superior do rato. a) Vista sagital; b) Vista dos ápices radiculares. ....	54
Figura 18: Imagens histológicas do ápice radicular do primeiro molar inferior esquerdo, em HE, 200x. a) Tecido ósseo alveolar bastante vascularizado com características de normalidade, GI (controle); b) Tecido ósseo alveolar alterado, observa-se compactação óssea de característica “marmorizada”, com diminuição dos espaços de nutrição do tecido ósseo, GII (teste). ....	57
Figura 19: Imagem histológica de um espécime pertencente ao grupo GIV. a) Presença do remanescente dentário em processo de reabsorção, envolvido por tecido conjuntivo fibroso (→). HE, 40x. b) .....	61
Figura 20: Imagem histológica de um espécime pertencente ao grupo GIII (controle). Observa-se presença de uma célula gigante multinucleada na proximidade do remanescente dentário (→). HE, 400x.....	61
Figura 21: a) Imagem tomográfica do hemicrânio do grupo teste (GVI), em corte sagital na proporção de 1:1; b) Imagem em aumento de 200% da região alveolar de maxila e mandíbula observa-se região hipodensa em maxila(→), compatível com defeito ósseo após extração em animal do grupo teste (GVI); c) Imagem tomográfica do hemicrânio do grupo controle (GV) em corte sagital na proporção de 1:1; d) Imagem em aumento de 200% da região alveolar de maxila e mandíbula observa-se em maxila raízes residuais cobertas por tecido ósseo remodelado (→) de um animal do grupo controle (GV). ....	65
Figura 22: a) Imagem histológica da região de primeiro molar superior esquerdo do grupo controle (GV). Observa-se remanescente dentário circundado por tecido em processo de neoformação óssea (área delimitada por tracejado azul). HE, 40x; b) Imagem da zona adjacente ao remanescente dentário ilustrando neoformação óssea em espécime do grupo GV. HE, 100x; c) Imagem histológica da região de primeiro molar superior esquerdo do grupo GVI. Observa-se área de necrose óssea (área delimitada por tracejado azul). HE, 40x; d) Imagem ilustrando osso necrótico em maior detalhe em animal do grupo GVI. HE, 100x. ....	67
Figura 23: a) Imagem histológica da região de primeiro molar inferior esquerdo do grupo controle (GV). Observa-se áreas de reabsorção e neoformação do tecido ósseo interradicular (área delimitada por tracejado azul). HE, 40x; b) Imagem da zona interradicular em processo de remodelação óssea em espécime do grupo GV. HE, 100x; c) Imagem histológica da região de primeiro molar inferior esquerdo do grupo GVI. Observa-se tecido ósseo circundado por intenso infiltrado inflamatório agudo encapsulando área de osso interradicular (área delimitada por tracejado azul). HE, 40x; d) Imagem ilustrando tecido ósseo sendo reabsorvido sem neoformação em animal do grupo GVI. HE, 100x.....	69

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 02: Mostra as diferenças entre as médias de percentual de tecido mineralizado entre os grupos GI e GII nas regiões de análise maxila e mandíbula. ....	57
Gráfico 03: Variação entre as médias de níveis de cinza entre os grupos GIII (Controle) e GIV (Teste). ..	59
Gráfico 04: Demonstra as diferenças entre as médias de percentual de níveis de cinza entre os grupos GV (controle) e GVI (teste) nas regiões de análise maxila e mandíbula. ....	63
Gráfico 05: Diferenças entre as médias de percentual de níveis de cinza entre os grupos GIV (três semanas) e GVI (oito semanas) nas regiões de análise maxila e mandíbula.....	71



## LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Comparação entre os grupos GI e GII quando as avaliações de níveis de cinza (NC) para maxila e mandíbula. ....	55
Tabela 02: Comparação entre os grupos GIII e GIV quando as avaliações de níveis de cinza para maxila e mandíbula. ....	59
Tabela 03: Comparação entre os grupos GV e GVI quando as avaliações de níveis de cinza para maxila e mandíbula. ....	64
Tabela 04: Comparação entre os grupos GV e GVI quando as avaliações de níveis de cinza para maxila e mandíbula. ....	71

## LISTA DE ABREVEATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

AZ	Ácido Zoledrônico
Bit	Dígito binário
°C	Graus Celsius
CDDB	Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca
CO <sup>2</sup>	Dióxido de Carbono
DBCD	Defeito com broca sobre a coroa dentária
DICOM	Comunicação de imagem digital em Medicina ( <i>Digital Imaging and Communications in Medicine</i> )
ED	Extração dentária
FPPs	Farnesil Difosfato
FOV	Área de aquisição da imagem
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Kg	Quilograma
K <sub>i</sub>	Constante de ionização
Kvp	Quilovoltagem Pico
HU	Escala Hounsfield
mA	Miliamperagem
mg	Miligrama
mm	Milímetros
mm <sup>2</sup>	Milímetros ao quadrado
NC	Nível de Cinza
nmol/L	nanomolar por litro
OMS	Organização Mundial de Saúde
pixel	Elemento de imagem
pH	Potencial de Hidrogênio
ROI	Região de Interesse ( <i>Region of Interest</i> )
s	segundo
UEA	Unidade de Experimentação Animal
UFPel	Universidade Federal de Pelotas
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UPE	Unidade de Patologia Experimental

voxel	Volumétrica de elemento de imagem ( <i>Volumetric Picture Element</i> )
μm	Micrometro
μmol/L	Micromol por litro

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	21
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	23
2.1	Reparo do Tecido Ósseo Alveolar.....	23
2.2	Bisfosfonatos.....	24
2.3	Osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos.....	27
3	PROPOSIÇÃO.....	33
3.1	Objetivo Geral.....	33
3.2	Objetivos Específicos.....	33
4	METODOLOGIA .....	34
4.1	Tipo de Estudo .....	34
4.2	Local de Realização .....	34
4.3	Considerações Éticas.....	34
4.4	Hipóteses.....	34
4.5	Cálculo Amostral.....	35
4.6	Descrição da Amostra .....	35
4.7	Administração do Fármaco .....	37
4.8	Delineamento do Estudo .....	38
4.8.1	EXTRAÇÃO DENTÁRIA.....	39
4.8.2	DEFEITO COM BROCA SOBRE A COROA DENTÁRIA .....	40
4.9	Morte e Preparo dos Espécimes .....	42
4.10	Estudo Tomográfico.....	43
4.11	Estudo Histológico.....	47
4.12	Análise Estatística .....	52
4.13	Descarte de Materiais.....	52
5	RESULTADOS.....	54
5.1	Efeito do Ácido Zoledrônico sobre o Tecido Ósseo Alveolar .....	54
5.1.1	RESULTADO DA ANÁLISE TOMOGRÁFICA: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS GI E GII.....	55
5.1.2	RESULTADO DA ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS GI E GII.....	56
5.2	Efeito do Ácido Zoledrônico sobre o Tecido Ósseo Alveolar após Exodontia e DCCD em Três Semanas de Terapia.....	58
5.2.1	RESULTADO DA ANÁLISE TOMOGRÁFICA: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS GIII E GIV.....	58
5.2.2	RESULTADO DO ESTUDO HISTOLÓGICO: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS GIII E GIV.....	60
5.2.2.1	Análise Maxilar .....	60
5.2.2.2	Análise Mandibular .....	62
5.3	Efeito do Ácido Zoledrônico sobre o Tecido Ósseo Alveolar após Exodontia e DCCD em Oito Semanas de Terapia.....	62
5.2.3	RESULTADO DA ANÁLISE TOMOGRÁFICA: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS GV E GVI.....	62
5.2.4	RESULTADO DO ESTUDO HISTOLÓGICO: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS GV E GVI.....	65
5.2.4.1	Análise Maxilar .....	66
5.2.4.2	Análise Mandibular .....	67
5.3	Efeito do Prolongamento da Terapia com Ácido Zoledrônico sobre o Tecido Ósseo Alveolar após Exodontia e DCCD.....	70

5.3.2	RESULTADO DO ESTUDO HISTOLÓGICO: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS GIV E GVI .....	72
5.3.2.1	Análise Maxilar .....	72
5.3.2.2	Análise Mandibular .....	72
6	DISCUSSÃO .....	73
7	CONCLUSÃO .....	78
8	FINANCIAMENTO.....	79
	REFERÊNCIAS .....	80
	ANEXOS.....	84
	Anexo A: Termo de aprovação de projeto pela Comissão de Ética no uso de animais. ....	84
	Anexo B: Autorização para o uso das dependências da clínica <i>Faciem3D</i> .....	85
	Apêndice A: Tabela com dados da análise tomográfica e níveis de cinza da maxila. ....	86
	Apêndice B: Tabela com dados da análise tomográfica e níveis de cinza da mandíbula.....	87
	Apêndice C: Tabela com dados referentes à análise histomorfométrica dos grupos GI e GII.....	88
	Apêndice D: Tabela com dados referentes à análise histológica da maxila.....	89
	Apêndice E: Tabela com dados referentes à análise histológica da mandíbula. ....	90

## 1 INTRODUÇÃO

A osteonecrose da arcada ósseo-dentária associada à bisfosfonatos caracteriza-se por um efeito adverso extremamente debilitante ao paciente, podendo trazer sérios riscos de morbidade aos mesmos. Os sinais clínicos podem variar de um processo inflamatório com dor, edema e rubor prolongados, evoluindo para exposição e sequestro ósseos, fístulas que se estendem desde tecido mucoso até a pele, parestesia e um risco aumentado a fraturas patológicas (MARX, 2005; KOS; BRUSCO; KUEBLER; ENGELKE, 2010; ALMĂŞAN et al, 2011).

Essa condição tem se tornado um desafio para clínica, uma vez que tentativas de tratamento parecem ser refratárias e a prevalências tem aumentado em progressão geométrica (MARX; CILLO; ULLOA, 2007; RUGGIERO, 2009).

O entendimento das alterações que levam ao desenvolvimento da osteonecrose dos maxilares relacionada aos bisfosfonatos ainda não está totalmente esclarecido. Contudo sabe-se que os bisfosfonatos são drogas sintéticas que derivam de um inibidor natural da reabsorção óssea o que lhes garante alta afinidade por cristais de fosfato de cálcio, agindo no ambiente intracelular, principalmente em células osteoclásticas, alterando o metabolismo ósseo. Essa classe de medicamento pode ser categorizada da seguinte maneira: os que possuem nitrogênio em sua fórmula, bisfosfonatos nitrogenados e aqueles que não possuem, bisfosfonatos não nitrogenados (RODAN, 1998; ROELOFS; THOMPSON; GORDON; ROGERS, 2006; RUSSELL; WATTS; EBETINO; ROGERS, 2008).

Atualmente os bisfosfonatos são amplamente utilizados na comunidade médica, possuindo excelentes resultados para o tratamento de doenças do metabolismo ósseo. No entanto, a osteonecrose associada à bisfosfonatos ainda é pouco difundida como sendo uma consequência ao uso da droga. A literatura descreve que a associação mais comumente realizada dá-se a partir de procedimentos invasivos cirúrgicos nas estruturas ósseas maxilares em pacientes que fizeram ou fazem uso da medicação. O risco aumenta em pacientes que realizaram uso da droga por via intravenosa e em períodos prolongados o que comprova sua relação dose-efeito (RUGGIERO, 2004; MARX, 2005; RUSSELL; WATTS; EBETINO; ROGERS, 2008; RUGGIERO, 2009; KOS; BRUSCO; KUEBLER; ENGELKE, 2010).

Estudos em animais comprovam a relação entre administração de bisfosfonatos e o surgimento de alterações no tecido ósseo alveolar. Fatores como a estagnação da atividade

osteoclástica e do processo de angiogênese, fundamentais para o reparo tecidual alveolar têm sido observados (KOBAYASHI et al, 2010; BI et al, 2010). Embora muitos trabalhos utilizem o modelo animal para reprodução da condição de osteonecrose da arcada óssea dentária associada à bisfosfonatos observada em humanos, pouco se sabe sobre o real efeito desta medicação no tecido ósseo alveolar *in vivo*, principalmente quando considerado o isolamento de outros fatores sistêmicos como indução de doença óssea prévia e terapia adjunta a imunossupressores.

Este trabalho objetiva investigar alterações no tecido ósseo alveolar de ratos, após terapia por um bisfosfonato nitrogenado (Ácido Zoledrônico) por meio de exame tomográfico e exame histológico.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Reparo do Tecido Ósseo Alveolar

O osso alveolar apresenta algumas particularidades associadas aos eventos que permeiam seu processo de reparo após exodontia. O conjunto de reações teciduais desencadeadas no osso alveolar têm por objetivo permitir que o espaço do alvéolo dental seja preenchido em sua integridade por tecido ósseo. A ferida decorrente de uma extração dentária difere daquela provocada na pele por incisão, na qual ocorre uma perda substancialmente maior de tecido mole, sendo que após a exodontia a cicatrização decorrerá por segunda intenção (CARVALHO; OKAMOTO, 1987; TEN CATE, 2008).

Logo após a remoção do dente do alvéolo, o sangue preenche a área de extração. A organização do coágulo inicia-se dentro das primeiras 24 a 48 horas com aumento da dilatação dos vasos sanguíneos dentro dos remanescentes de ligamento periodontal, seguido pela migração de leucócitos e formação de uma camada de fibrina. Na primeira semana o coágulo forma um arcabouço temporário sobre o qual as células inflamatórias migram. Osteoclastos acumulam-se por toda a crista óssea alveolar, iniciando o estágio de reabsorção ativa da crista óssea. Angiogênese continua a ocorrer nos remanescentes de ligamento periodontal. Na segunda semana, o coágulo continua a organizar-se pela fibroplastia, e novos vasos sanguíneos começam a penetrar em direção ao centro do coágulo. Trabeculados de osteóide estendem-se lentamente do alvéolo para o interior do coágulo e a atividade osteoclástica da margem cortical da cavidade alveolar é mais distinta. Até a terceira, semana a cavidade alveolar é preenchida com tecido de granulação e tecido ósseo pouco calcificado é formado na perifeira da lesão. A superfície da lesão é completamente reepitelizada (MILORO, 2008).

A cavidade onde anteriormente repousava a raiz dentária fica em um primeiro momento preenchida por tecido ósseo imaturo, o qual apresenta fibras colágenas dispostas sem organização definida, possuindo menor quantidade de minerais e maiores proporções de osteócitos. Gradativamente ocorre a substituição desse tecido imaturo, primário, por um tecido ósseo secundário, lamelar, caracterizado por uma rede de fibras colágenas organizadas em lamelas que ao ficarem dispostas em torno dos vasos sanguíneos formam os sistemas de Havers. Os osteócitos estão contidos em lacunas entre ou dentro de lamelas ósseas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; TEN CATE, 2008).



O processo de reparo pode ser acompanhado radiograficamente, em período imediato ao pós-operatório, evidenciam-se os limites do alvéolo por um contorno radiopaco contínuo que se caracteriza a lâmina dura. Aos 63 dias após a extração, notam-se áreas radiopacas nas proximidades da lâmina dura e em direção à área central do alvéolo. Os eventos de reparo alveolar com neoformação de tecido ósseo iniciam no décimo dia, sendo completa apenas quando há o preenchimento total do alvéolo por tecido ósseo e remodelamento da crista alveolar, depois de dez a doze semanas o local da extração não pode mais ser identificado. No alvéolo de ratos os eventos desenvolvem-se em torno do sétimo dia e 24 dias pós-operatórios já se pode verificar o reparo alveolar em sua totalidade (CARVALHO; OKAMOTO, 1987; TEN CATE, 2008).

Ocasionalmente o coágulo sanguíneo não é formado ou pode ser desintegrado, o que vem a causar uma osteíte alveolar localizada. Em tais circunstâncias o reparo torna-se mais demorado e o preenchimento da cavidade ocorre gradualmente. Na ausência de uma matriz saudável, a união entre osso reparado e osso alveolar remanescente ocorre com uma velocidade muito mais lenta, diante de tal evento o alvéolo potencialmente infectado permanece aberto e parcialmente coberto com epitélio hiperplásico por longos períodos (MILORO, 2008).

Guglielmotti e Cabrini (1985) em seu trabalho observaram que após extrações dentárias em ratos *Wistar*, aos sete dias, ocorre o período de maior atividade reabsortiva óssea. Aos 60 dias o reparo ósseo está completo, uma vez que tecido ósseo preenche a cavidade alveolar por completo, apresentando uma continuidade homogênea entre o antigo alvéolo e a mandíbula.

## **2.2 Bisfosfonatos**

Os bisfosfonatos são amplamente usados no manejo de pacientes com doenças relacionadas a alterações no metabolismo ósseo. Pertencem à maior classe de drogas anti-reabsortivas, atuando em enfermidades como osteoporose, doença de Paget, neoplasias como mieloma múltiplo e hipercalemia maligna, metástases ósseas associadas ao câncer de mama, próstata, pulmão e a outros tumores de tecidos moles (MARX, 2005; RUSSELL; WATTS; EBETINO; ROGERS, 2008; RUGGIERO, 2009; KOS; BRUSCO; KUEBLER; ENGELKE, 2010). Idosos frequentemente apresentam perda substancial de densidade óssea, onde fraturas são uma comum intercorrência, por conseguinte um grande risco para

morbidade. O uso de bisfosfonatos vem sendo uma alternativa eficaz para redução desse risco, melhorando a qualidade de vida destes pacientes (PHAM et al, 2011). Siris e colaboradores (2011) realizaram um estudo estimativo entre a relação do uso de bisfosfonatos e redução de fraturas em mulheres do período pós-menopausa, no qual se pode observar a evidente redução do risco a fraturas em pacientes que utilizavam bisfosfonatos por via oral.

Os bisfosfonatos são compostos químicos que possuem alta afinidade com os tecidos ósseos. Sua característica de ação está relacionada ao seu mecanismo seletivo sobre a atividade osteoclástica, por serem análogos sintéticos do pirofosfato, um inibidor natural da reabsorção óssea, o que lhes proporciona alta afinidade aos cristais de fosfato de cálcio (hidroxiapatita) (RODAN, 1998; RUSSELL; WATTS; EBETINO; ROGERS, 2008; RUGGIERO, 2009). Os bisfosfonatos podem ser divididos em dois grupos conforme a presença ou ausência de nitrogênio em sua composição. A presença do átomo de nitrogênio confere ao medicamento maior poder de inibição reabsortiva. Dentre a classe de bisfosfonatos nitrogenados pertence o Alendronato, Ácido Zoledrônico, Risendronato, Pamidronato, Ibandronato (ROELOFS; THOMPSON; GORDON; ROGERS, 2006). Durante a reabsorção, no ambiente ácido da lacuna de Howship, os bisfosfonatos englobados no osso são liberados, atingem altas concentrações em solução ou na forma de sais de cálcio e são internalizados pelos osteoclastos e macrófagos por endocitose, afetando-os diretamente, promovendo a perda de função ou apoptose da célula, por inibição de sistemas enzimáticos ou produção de metabólitos citotóxicos. Em consequência da menor atividade osteoclástica, o metabolismo ósseo é alterado em sua relação osteoclasto e osteoblasto, o que favorece a neoformação óssea com aumento da área de osso trabecular (ROELOFS; THOMPSON; GORDON; ROGERS, 2006; RUSSELL; WATTS; EBETINO; ROGERS, 2008).

Os bisfosfonatos nitrogenados agem intracelularmente bloqueando a síntese da enzima farnesil difosfato (FPPs) importante na via mevalonato. A interrupção dessa via impede a formação de dois metabólitos, o farnesol e geranylgeraniol, que são essenciais para o funcionamento adequado da célula. Esta enzima é inibida por concentrações nanomoleculares de bisfosfonatos nitrogenados, neste quesito o Ácido Zoledrônico é extremamente potente mesmo em concentração picomolares (Quadro 01). Os bisfosfonatos que não possuem um átomo de nitrogênio em sua estrutura química não inibem proteínas, possuem um mecanismo diferente de ação o qual parece envolver principalmente a formação

de metabolitos citotóxicos em osteoclastos. Ao que se parece os bisfosfonatos nitrogenados, guardam alguma capacidade antitumoral, contudo este efeito ainda não está bem esclarecido (RODAN, 1998; COXON; OADES; KIRBY; COLSTON, 2004; ROELOFS; THOMPSON; GORDON; ROGERS, 2006).

**Quadro 01:** Tabela referente ao potencial inibidor da síntese da FPP dos bisfosfonatos nitrogenados.

<b>Bisfosfonato</b>	<b>IC<sub>50</sub> (nmol/L), enzima recombinante humana</b>	<b>IC<sub>50</sub> (nmol/L), enzima purificada recombinante humana</b>	<b>K<sub>i</sub> (nmol/L)</b>
<b>Pamindronato</b>	200	500	ND
<b>Alendronato</b>	50	340	ND
<b>Ibandronato</b>	20	ND	ND
<b>Risendronato</b>	10	003.9	0.34
<b>Ácido Zoledrónico</b>	3	ND	0.07
<b>Minodronato</b>	3	ND	ND

ND: Não determinado;

IC<sub>50</sub>: Quantidade necessária para inibir 50% da atividade;

K<sub>i</sub>: Constante de ionização;

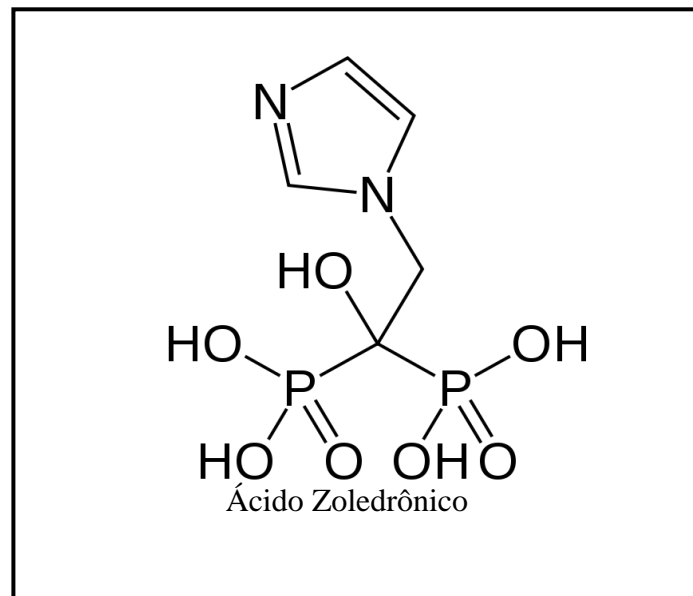
Fonte: ROELOFS; THOMPSON; GORDON; ROGERS, 2006.

Estudos *in vitro* demonstram que bisfosfonatos nitrogenados possuem efeito sobre praticamente todas as células, atingindo inclusive culturas de células osteoclásticas, osteoblásticas, macrófagos, células epiteliais, endoteliais. Sendo os osteoclastos e os macrófagos os mais sensíveis a baixas concentrações (1-10 µmol/L) *in vitro* (ROELOFS; THOMPSON; GORDON; ROGERS, 2006).

O Ácido Zoledrônico [1-Hydroxy-2-(1H-imidazole-1-yl) ethylidene] (Figura 01) é tido como um dos mais potentes bisfosfonatos nitrogenados de nova geração. Sua eficácia na adesão da matriz mineralizada e na apoptose de células tumorais mesmo em doses baixas já tem sido comprovado (COXON 2004). Em modelo animal rato, o Ácido Zoledrônico provou ser efetivo em prevenir doenças ósseas com apenas uma única dose, em animais que haviam sido injetados por células tumorais (CROUCHER et al, 2003). Metcalf; Pandha e Morgan (2011) observaram em seu trabalho o efeito do bisfosfonatos sobre a angiogênese. Os resultados mostraram a característica dose-dependente dessas drogas sobre as células endoteliais, quanto maior a dose menor a capacidade de formação de novos vasos.

Devido ao amplo emprego dessa droga o esquema de administração pode ser bastante variável. Comumente reserva-se o uso de bisfosfonatos via oral para casos de osteoporose e osteopenia. Porém, trabalhos recentes com a administração de doses anuais de Ácido Zoledrônico (5mg) ao longo de três anos, em pacientes que apresentam osteoporose pós-menopausa, mostra significativa redução no risco de fraturas de ossos longos. Com isso a indicação para o uso dessa medicação vem se tornando mais frequente (BLACK et al, 2007).

**Figura 1:** Fórmula química do Ácido Zoledrônico.



Fonte: Elaborado pela autora (2013).

### 2.3 Osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos

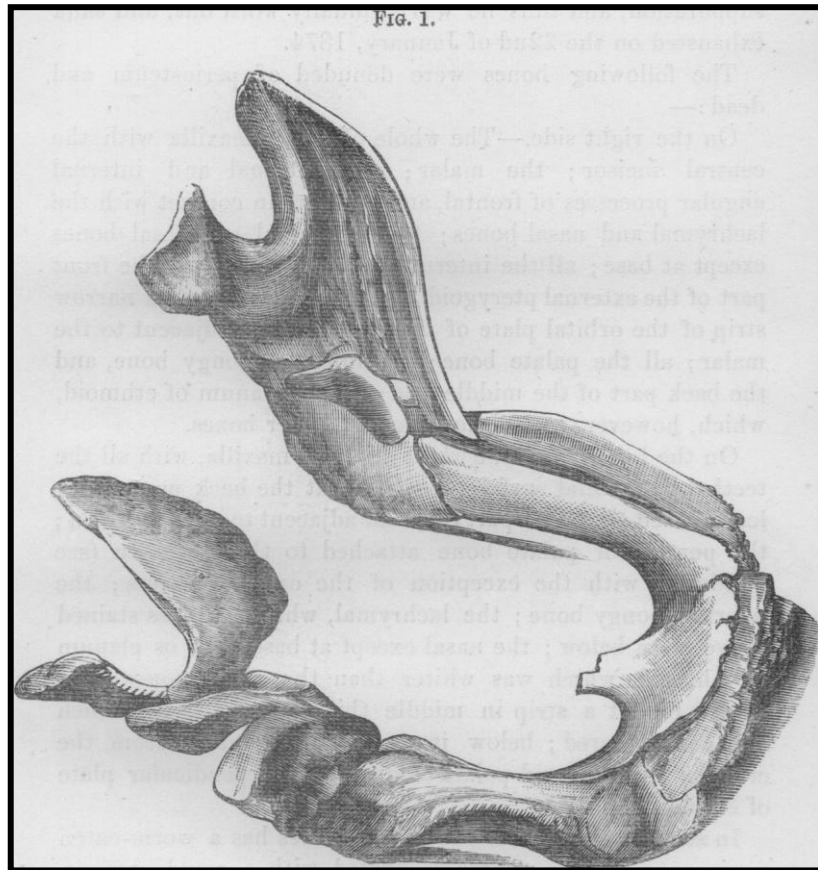
A ocorrência de necrose óssea associada ao uso de bisfosfonatos é considerada de exclusividade do complexo maxilomandibular. Vem sendo descrita desde 2003 como um importante efeito adverso. Inicialmente relacionada ao uso de drogas com alta dosagem e administração intravenosa como Pamidronato e Ácido Zoledrônico. Contudo vem tornando-se frequente a associação também a drogas de administração por via oral como é o caso do Alendronato Sódico (MARX, 2003; 2005).

Apesar dos relatos de osteonecrose dos maxilares relacionada aos bisfosfonatos terem seu início apenas em meados do século XXI, relatos de necrose dos ossos maxilares associada ao fósforo datam de muito antes. Trabalhadores expostos por anos aos vapores de fósforo

apresentavam em alguns casos, efeitos como exposição de tecido ósseo do complexo maxilo-mandibular. Transcreveu-se um dos casos relatados intitulado “*A Case of Necrosis Of The Jaw And Other Bones From The Fumes Of Phosphorus.*” (SAVORY, 1874):

“... Em cima da mesa estão a mandíbula e alguns ossos adjacentes de um rapaz, de 18 anos, que tinha sido exposto por um longo período de tempo a vapores de fósforo (Figura 2)... Toda a face, mas especialmente a região ao longo do maxilar inferior do lado direito, era muito dolorosa, inchada, e a pele estava tensionada, pálida e brilhante. A gengiva também de ambas as maxilas superior e inferior estava indevidamente vascularizada e muito intumescida. Estes sintomas aumentaram, houve supuração, e depois, a mandíbula foi encontrada nua e evidentemente, em um estado de necrose...”

**Figura 02:** Desenho representativo referente à mandíbula do paciente após necropsia.



Fonte: (SAVORY, 1874).

O caso relatado, guardada as proporções, muito se assemelha com o quadro de um paciente apresentando osteonecrose por bisfosfonatos dos tempos atuais. Mesmo após a tentativa de ressecção cirúrgica da região necrótica e melhora em um primeiro momento, o paciente após alguns meses evoluiu para óbito.

Atualmente a condição para ser definida como osteonecrose da arcada ósseo-dentária associada à bisfosfonatos, segundo Ruggiero (2009) deve ser associada a tratamento atual ou prévio com bisfosfonatos, exposição do tecido ósseo do complexo maxilomandibular ao meio bucal persistente e ausência de história de radioterapia na região de cabeça e pescoço.

Dentre as alterações clínicas mais comumente encontradas estão à exposição óssea, dor, sequestro ósseo, fístulas em tecido mucoso podendo estender-se até superfície cutânea, edema, parestesia e suscetibilidade a fraturas patológicas (MARX, 2005; KOS; BRUSCO; KUEBLER; ENGELKE, 2010; ALMĂŞAN et al, 2011). Frequentemente está relacionada a procedimentos invasivos prévios tais como exodontias, remoção de cistos, implantes

dentários e trauma dento-alveolar (RUGGIERO et al, 2004; MARX, 2005; KOS; BRUSCO; KUEBLER; ENGELKE, 2010). Contudo não é incomum a ocorrência de lesões mesmo na ausência de intervenções prévias, casos de trauma devido ao uso de prótese removíveis e condições anatômicas também parecem ter associação (MARX, 2005). O sítio de maior incidência parece ser a mandíbula (RUGGIERO et al, 2004; MARX, 2005; KOS; BRUSCO; KUEBLER; ENGELKE, 2010).

Um importante aspecto relacionado aos bisfosfonatos é a sua relação dose-efeito. Para que se visualizem efeitos mais acentuados da inibição do metabolismo ósseo é necessário o aumento da dosagem do medicamento, assim como há a influência da frequência de administração. A meia vida dos bisfosfonatos não pode ser considerada proporcional à duração de seus efeitos, em média após a administração intravenosa desaparecem do plasma rapidamente, com uma meia vida de uma a duas horas. Porém, uma vez que estes se encontram ligados ao osso permaneceram sepultados por longos períodos, e só serão liberados quando houver reabsorção do tecido ósseo (LIN, 1996; RUSSELL; WATTS; EBETINO; ROGERS, 2008).

Em um estudo com 63 casos de pacientes com osteonecrose de mandíbula e maxila que haviam feito uso de bisfosfonatos intravenoso e via oral, 38% apresentaram lesões envolvendo maxila e 68% apresentaram envolvimento com o osso mandibular, 14% não apresentavam história previa de atendimento invasivo odontológico. Nos achados clínicos foram observadas a presença de exposição óssea e necrose dos tecidos ósseos alveolares em todos os indivíduos da amostra. Os autores sugeriram cautela aos clínicos devido ao potencial de desenvolvimento de necrose óssea alveolar pelo uso de bisfosfonatos (RUGGIERO et al, 2004).

A busca por alternativas de tratamento para esta enfermidade tem sido investigada desde seus primeiros relatos. Tentativas de debridamento local com recobrimento da região óssea exposta através de retalho mucoperiosteal frequentemente demonstram fracasso e maior exposição da ferida por consequência, tornando as estruturas mais suscetíveis a fraturas patológicas. Terapia com oxigênio hiperbárico utilizada para tratamento de osteomielite crônica não demonstra efeitos semelhantes quando utilizada no tratamento para osteonecrose secundária ao uso de bisfosfonatos, fato este que pode ser explicado devido aos diferentes mecanismos de desenvolvimento das duas condições (MARX; CILLO; ULLOA, 2007; RUGGIERO, 2009; SEDGHIZADEH et al, 2008).

Autores vêm descrevendo o uso de diferentes técnicas no intuito de desenvolver um

protocolo eficaz para o manejo dessa condição. A ressecção das áreas necróticas e a aplicação de plasma rico em plaquetas foram reportadas, em uma amostra de 25 pacientes por Curi e colaboradores (2011). Esses autores obtiveram 80% de sucesso, relatando completo reparo e recobrimento da área de osso exposta em 36 meses de acompanhamento. Cella e colaboradores (2011) descreveram o emprego de um concentrado de células tronco autógenas com inserção internamente à lesão em um caso de osteonecrose por uso de bisfosfonatos, com boa evolução do quadro em pós-operatório de curto prazo.

O uso de antimicrobianos por longos períodos tem sido aplicado. Contudo, não há normatização na utilização dos mesmos. Autores têm sugerido que alterações na microbiota bucal podem desempenhar um papel crítico na patogênese do desenvolvimento da osteonecrose (SEDGHIZADEH, 2008; NAIK; RUSSO, 2009). Marx; Cillo e Ulloa (2007) descrevem achados de elevados níveis de micro-organismos *Actinomyces*, *Moraxella*, e espécies *Eikenella*, em sua série de 30 casos. Sedghizadeh *et al* (2008) observaram a presença espécies bacterianas incluindo *Fusobacteria*, Bacilos, *Actinomyces*, Estafilococos, Estreptococos, *Selenomonas* e três diferentes tipos de treponemas, em análise microbiológica realizada através de eletromicroscopia de varredura, de quatro pacientes portadores de osteonecrose que fizeram uso de bisfosfonatos. Neste estudo os autores observaram ainda que a reabsorção óssea evidente em todos os casos foi potencialmente causada pelo biofilme bacteriano presente, uma vez que não foram observadas evidências de células como osteoclastos adjacente ou no interior da lesão.

Pesquisas têm sido realizadas a fim de reproduzir, em modelo animal, características semelhantes à osteonecrose dos maxilares observada em pacientes que fazem uso de bisfosfonatos, como método para estudo da patogênese dessa condição. Bi e colaboradores (2010) confirmaram em seu estudo realizado com uma amostra composta por ratos, que longos períodos de uso de bisfosfonatos em altas doses são capazes de desenvolver defeito ósseo e impossibilidade de reparo após exodontia.

Na revisão do assunto realizada por Russell e colaboradores (2008), destacam que há uma mudança do padrão ósseo devido à inibição do processo reabsortivo, o que tem efeito direto sobre a densidade óssea mesmo diante da ausência de uma doença metabólica prévia. Kobayashi e colaboradores (2010) avaliaram os efeitos no reparo alveolar de ratos submetidos à terapia com um bisfosfonato nitrogenado (Ácido Zoledrônico), após extração dentária. A análise histomorfométrica mostrou que a migração de células endoteliais para região do alvéolo foi significativamente menor no grupo que recebeu bisfosfonato



comparado ao grupo controle, sugerindo que possa existir inibição da angiogênese, fato crítico para o reparo alveolar.

As condições que levam ao quadro de osteonecrose da arcada ósseo-dentária por bisfosfonatos permanecem desconhecidas. A maioria dos estudos envolvendo indução da doença em modelo animal realiza associação do bisfosfonato com imunossupressores. O presente estudo propõe-se a analisar os efeitos do uso dessa medicação ao tecido ósseo alveolar, bem como o desenvolvimento de um modelo de estudo reprodutivo utilizando o Ácido Zoledrônico como única medicação indutora e ausência de doença metabólica prévia.

### **3 PROPOSIÇÃO**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O presente estudo propõe-se a avaliar a estrutura óssea alveolar de ratos submetidos à terapia com Ácido Zoledrônico.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Avaliar qualitativamente o reparo ósseo alveolar, após extração, em ratos submetidos à administração de Ácido Zoledrônico, na região de primeiros molares superior.

Avaliar qualitativamente alterações na estrutura óssea alveolar, após defeito com broca sobre a coroa dentária do primeiro molar inferior, em ratos submetidos à administração de Ácido Zoledrônico.

Avaliar quantitativamente a densidade de imagem no tecido ósseo alveolar em ratos submetidos à administração de Ácido Zoledrônico, na região de primeiros molares superior e inferior.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Tipo de Estudo**

Estudo experimental controlado em animais, cego e com amostragem selecionada de forma aleatória ou probabilística simples - randomizada.

### **4.2 Local de Realização**

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

-Unidade de Experimentação Animal (UEA)

-Unidade de Patologia Experimental (UPE)

Clínica de Radiologia Odontológica *FACIEM 3D*

### **4.3 Considerações Éticas**

Nesta pesquisa foram observados os princípios éticos para experimentação em animais, que constam na Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca) que regulamenta e estabelece procedimentos para o uso científico de animais; respeitando-se também os Princípios Éticos na Pesquisa Experimental, determinados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. O referido projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o número de projeto 120108 (Anexo A).

### **4.4 Hipóteses**

a. O Ácido Zoledrônico, isoladamente, retarda o reparo ósseo alveolar após extração dentária.

b. A manutenção da terapia com uso de bisfosfonato nitrogenado, após procedimento de exodontia, acentua e agrava a diminuição da capacidade de reparo ósseo.

- c. A terapia com Ácido Zoledrônico altera o tecido ósseo alveolar na ausência de procedimento invasivo.
- d. O Ácido Zoledrônico diminui a capacidade reacional dos tecidos de suporte dentário.

#### **4.5 Cálculo Amostral**

Para determinação do tamanho da amostra, deste estudo com modelo animal experimental o rato, foi determinado o “n” de seis para cada grupo, baseando-se nos estudos de Bi et al, 2010; Kobayashi et al, 2010; Hokugo et al, 2010.

O tamanho da amostra foi calculado, com um nível de significância de 5% para um poder de estudo de 80%. Para uma diferença mínima detectável entre as médias de 5,0% e um desvio-padrão esperado dos resíduos de 1,2%. Os autores consideraram a inclusão de mais um animal para cada grupo prevendo possíveis perdas e exclusões durante o decorrer do experimento, totalizando um “n” amostral de sete animais.

#### **4.6 Descrição da Amostra**

A amostra para o estudo foi composta por 42 ratos albinos, heterogênicos, da espécie *Rattus norvegicus albinus*, cepa *Wistar*, machos, clinicamente sadios com idade média de 60 dias e peso médio de 250 gramas.

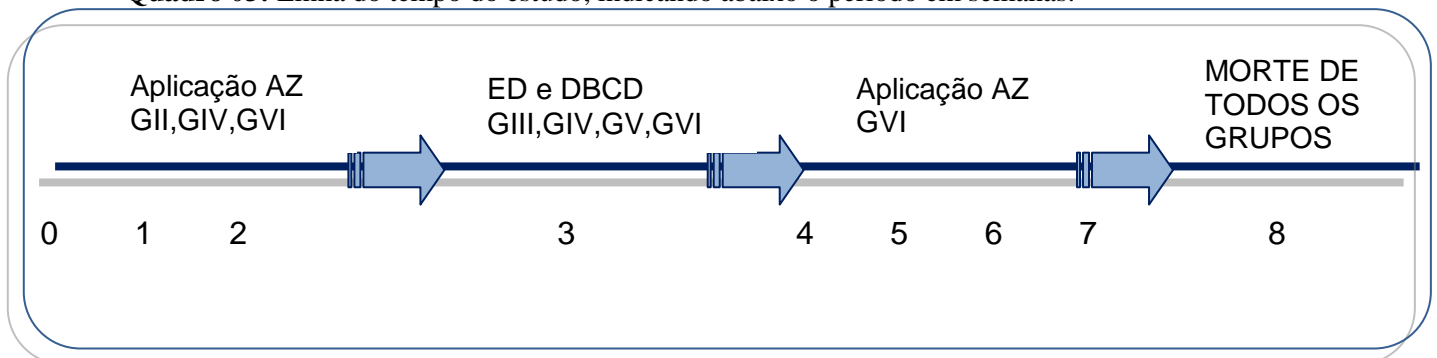
Dividiu-se a amostra em seis grupos com sete animais em cada (Quadro 02). Os diferentes grupos foram dispostos considerando variações quanto ao procedimento de extração dentária (ED) e defeito com broca na coroa dentária (DBCD), administração do Ácido Zoledrônico e duração da terapia.

**Quadro 02:** Distribuição dos grupos e variáveis.

Grupos	Distribuição de animais por grupo	Administração do bisfosfonato	ED e DBCD	Tempo para extração e DBCD (semanas)	Tempo de administração da medicação (semanas)	Tempo de observação (semanas)
<b>GI</b>	N=07	Não	Não	---	---	08
<b>GII</b>	N=07	Sim	Não	---	03	08
<b>GIII</b>	N=07	Não	Sim	03	03	08
<b>GIV</b>	N=07	Sim	Sim	03	03	08
<b>GV</b>	N=07	Não	Sim	03	08	08
<b>GVI</b>	N=07	Sim	Sim	03	08	08

Fonte: Elaborado pela autora (2013).

Os grupos GI e GII não receberam tratamento de ED ou DBCD, nesses grupos houve variação apenas quanto à terapia com Ácido Zoledrônico. Os grupos GIII, GIV, GV e GVI foram comuns quanto ao tratamento por ED e DBCD, variando entre si quanto à terapia de Ácido Zoledrônico e a duração da terapia. Nos grupos GII, GIV foram administradas três doses da medicação, já no grupo GVI foram aplicadas, no total, oito doses de Ácido Zoledrônico (Quadro 03).

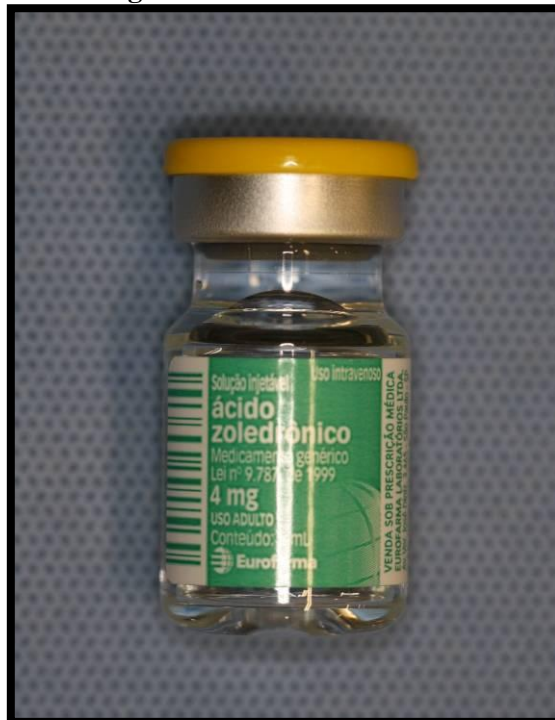
**Quadro 03:** Linha do tempo do estudo, indicando abaixo o período em semanas.

Fonte: Elaborado pela autora (2013).

#### 4.7 Administração do Fármaco

O bisfosfonato empregado foi o Ácido Zoledrônico<sup>1</sup> por via intraperitoneal, na dosagem de 0,2mg/kg, semanalmente (Figura 03). Para obtenção da dose, o fármaco foi diluído em soro fisiológico. Considerando o metabolismo do animal utilizado, a frequência de administração do fármaco foi de uma dose semanal, o que simularia uma equivalência de dose para o tratamento em humanos.

**Figura 03:** Ácido Zoledrônico



Fonte: Autora (2013).

Tendo em vista que não há padronização para o uso de Ácido Zoledrônico em modelo animal, os autores utilizaram uma sobredosagem, uma vez que a taxa de excreção para esta medicação, em ratos, ainda não foi determinada. Segundo Bi et al (2010) não há diferenças entre aplicação de intravenosa e intraperitoneal da administração de Ácido Zoledrônico na indução de osteonecrose.

Para administração do fármaco nos grupos GII, GIV, GVI, não foi realizada anestesia, o animal foi contido colocando-se a mão sobre o dorso e a caixa torácica, e a cabeça apreendida entre o polegar e o indicador, imediatamente atrás da mandíbula. A pesagem dos animais para cálculo das dosagens foi realizada a cada sete dias previamente a administração

---

<sup>1</sup> Ácido Zoledrônico®, Eurofarma S.A, RJ, Brasil.

do fármaco.

Os animais dos grupos GI, GIII, GV, receberam doses equivalentes de soro fisiológico, com o objetivo de evitar viés quanto à manipulação do animal. A dose total de Ácido Zoledrônico recebida pelos grupos GII e GIV foi de 0,6mg/kg durante três semanas de indução. O grupo GVI recebeu um total equivalente de 1,6mg/kg durante oito semanas.

#### 4.8 Delineamento do Estudo

Durante todo o período do experimento, os animais foram mantidos nas dependências da Unidade Experimental Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em temperatura ambiente de 23°C (mais ou menos um grau), alimentados com ração sólida comercial e água *ad libitum*, e foram submetidos a exames veterinários para a exclusão de qualquer patologia concomitante, que poderia interferir com os resultados do presente trabalho.

Os animais foram identificados através de marcações com caneta de retroprojeter na cauda de cada animal. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas, cobertas por uma grade metálica, na qual era alocado o bebedouro e dispensada à ração.

Os animais dos grupos GIII, GIV, GV, GVI foram submetidos a procedimento cirúrgico para remoção do primeiro molar superior esquerdo e defeito com broca na coroa dentária do primeiro molar inferior esquerdo, após a administração da terceira dose do Ácido Zoledrônico, aos 21 dias. Durante o decorrer dos procedimentos cirúrgicos foram mantidos os critérios de assepsia. Após a apreensão do animal pelo dorso, foi realizada a anestesia através da aplicação de injeção intraperitoneal da solução anestésica, na região interna do membro posterior esquerdo. Para tal, utilizou-se Cloridrato de Xilazina a 2%<sup>2</sup> e Cloridrato de Cetamina a 10%<sup>3</sup>, respectivamente, na dosagem de 10mg/kg e 100mg/kg (HARKNESS; WAGNER, 1993).

Após os procedimentos anestésicos, os animais foram colocados individualmente em posição de decúbito-ventral, fixados sobre uma mesa plana aquecida, a abertura bucal foi mantida apoiando-se os incisivos superiores e inferiores com atilhos elásticos.

---

<sup>2</sup> Anasedan, Sespo Indústria e Comércio Ltda, Jacareí, SP.

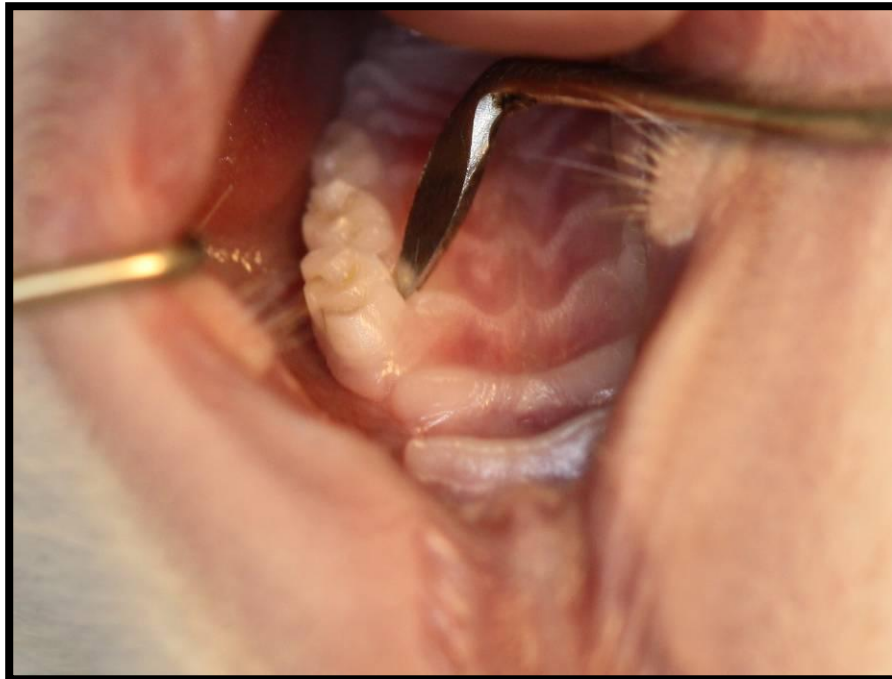
<sup>3</sup> Ketamina Anger (Ketamina 10 %), União Química Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo, SP.

#### 4.8.1 EXTRAÇÃO DENTÁRIA

O procedimento cirúrgico para extração dentária iniciou pela sindesmotomia do primeiro molar superior esquerdo com auxílio de um descolador adaptado a anatomia da região, seguido por luxação e remoção do elemento dentário. Após foram realizados os cuidados com a ferida operatória, que incluíram irrigação cuidadosa e hemostasia através de compressão com gaze no alvéolo dentário (Figura 04 e Figura 05).

Os dentes removidos dos animais foram identificados e mantidos em água<sup>4</sup> para posterior verificação e registro de fraturas radiculares, por meio de uma lupa<sup>5</sup> com aumento de duas vezes.

**Figura 04:** Imagem do momento de realização da etapa cirúrgica de sindesmotomia na região palatina do primeiro molar superior esquerdo.



Fonte: Autora (2013).

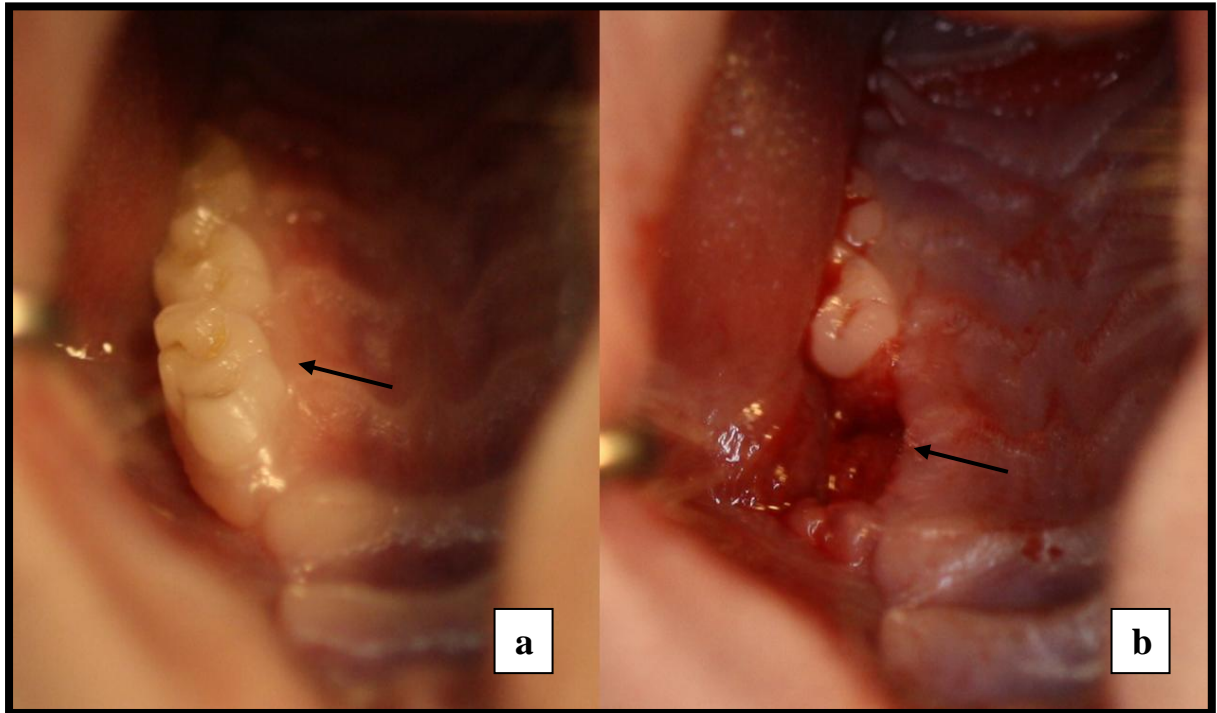
---

<sup>4</sup> KabiPac (Água para injeção 1000ml), fresenius Kabi Ltda, Aquiraz, CE, Brasil.

<sup>5</sup> Carl Zeiss, 700mA, Germany.



**Figura 05:** a) Primeiro molar superior esquerdo íntegro. (↔) b) Alvéolo dentário após extração do primeiro molar superior esquerdo (↔).



Fonte: Autora (2013).

#### 4.8.2 DEFEITO COM BROCA SOBRE A COROA DENTÁRIA

O procedimento para a realização do defeito com broca sobre a coroa dentária foi executado com o auxílio de uma broca<sup>6</sup> esférica carbide tamanho nº4 haste longa para peça de mão, com diâmetro de 1,4mm, na coroa dentária do primeiro molar inferior esquerdo.

Conforme análise em crânio seco, a coroa dentária dos primeiros molares inferiores de ratos possuem 1,3mm da borda incisal até a junção amelo-cementária. O defeito realizado com broca compreendeu a totalidade da ponta ativa da mesma, gerando um defeito oclusal de 1,4mm de profundidade por 1,4mm de largura, estendendo-se deste modo até a região de furca dentária (Figura 06). Após foram realizados os cuidados com a ferida operatória, que incluíram irrigação cuidadosa e hemostasia através de compressão com gaze no alvéolo dentário (Figura 07).

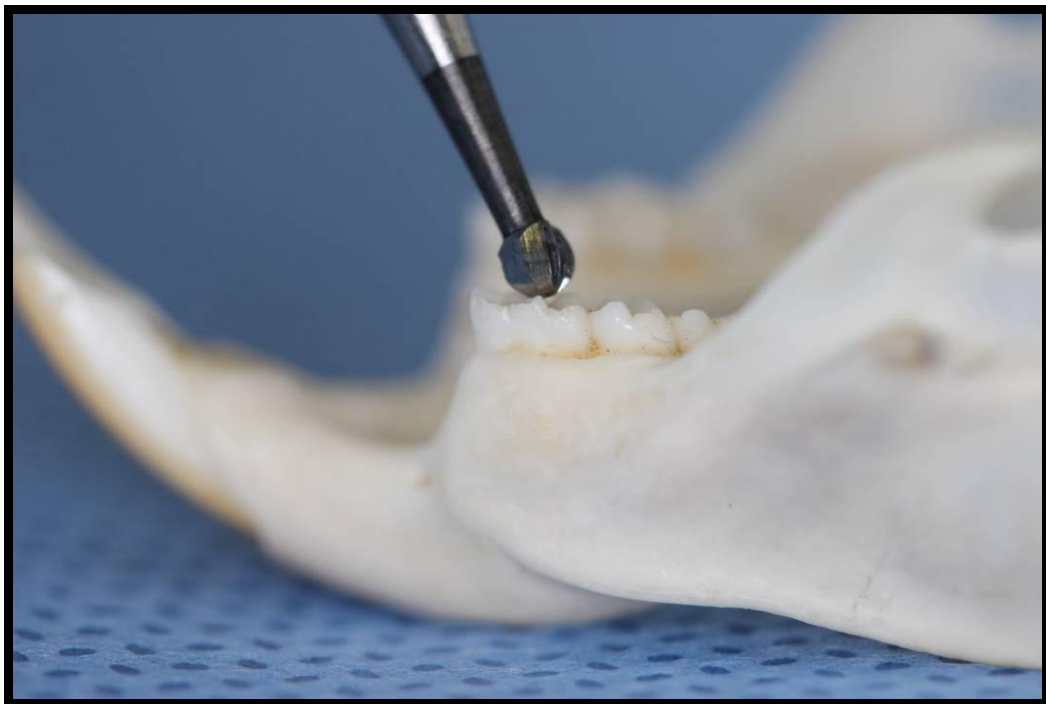
Para analgesia todos os animais receberam imediatamente, após o término dos

<sup>6</sup> Broca carbide esférica nº4, Labordental, São Paulo, SP, Brasil.

procedimentos cirúrgicos, Cloridrato de Tramadol<sup>7</sup>, que foi aplicado via intramuscular na dose de 5mg/kg, no pós-operatório imediato e uma segunda dose 24 horas após. No pós-operatório imediato, os animais permaneceram em incubadoras aquecidas a uma temperatura de 30°C, até que obtivessem condições para retornar as gaiolas e ao alojamento.

Todas as etapas dos procedimentos foram supervisionadas pela Médica Veterinária Fabíola Schons Meyer (CRMV 9721).

Figura 06: Simulação do posicionamento da broca esférica sobre a coroa dentária do primeiro molar inferior esquerdo em crânio seco. Observam-se as dimensões da broca em relação ao dente.

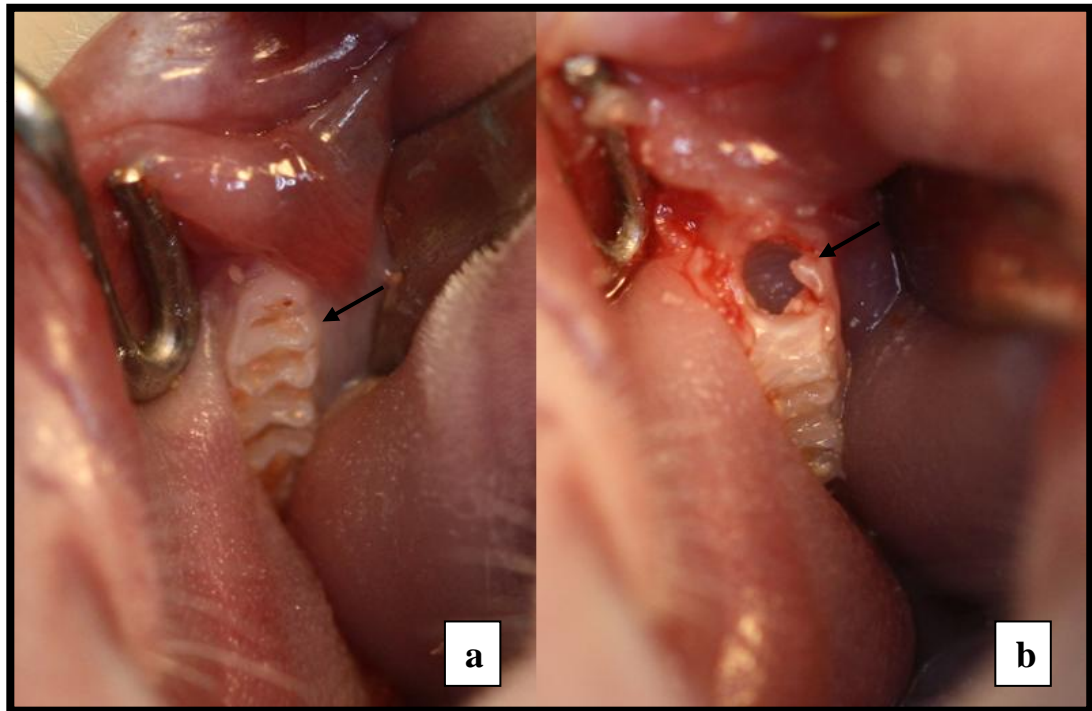


Fonte Autora (2013).

---

<sup>7</sup> Cloridrato de Tramadol 100mg/2ml, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil.

**Figura 07:** a) Primeiro molar inferior esquerdo íntegro (←). b) Defeito provocado pela aplicação da broca sobre a coroa do primeiro molar inferior esquerdo (←).



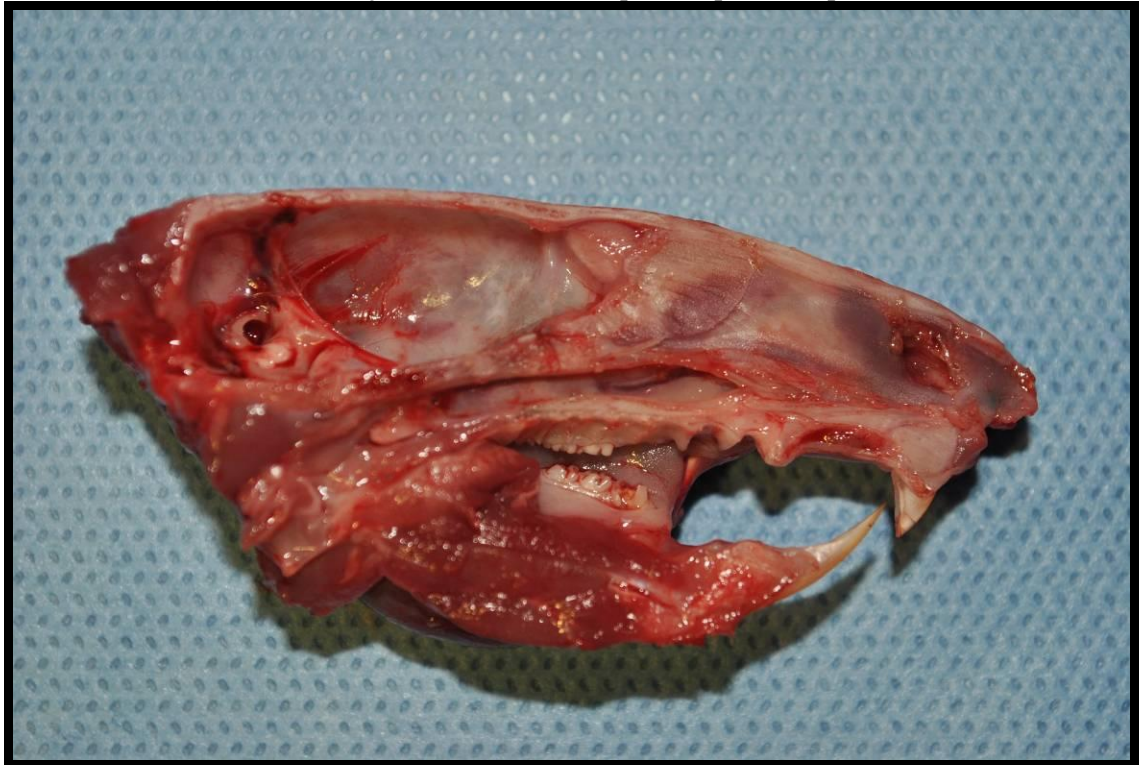
Fonte: Autora (2013)

#### 4.9 Morte e Preparo dos Espécimes

Decorrido o tempo de oito semanas, a partir do início do estudo foram realizadas as mortes dos animais através da utilização de câmara de CO<sup>2</sup>, com o intuito de preservar as estruturas a serem examinadas.

Imediatamente após a morte, foi realizada a necropsia com desnudamento, decapitação e hemisseção sagital do crânio, dividindo em porção esquerda e porção direita (Figura 08).

**Figura 08:** Secção de hemicrânio esquerdo após necropsia.



Fonte Autora.

As peças operatórias correspondentes ao hemicrânio direito e hemicrânio esquerdo foram colocadas imediatamente em recipientes plásticos devidamente identificados, fixadas e conservadas em formalina neutra tamponada a 10%, com a finalidade de evitar as alterações *post mortem*.

#### **4.10 Estudo Tomográfico**

As peças referentes aos hemicrânios esquerdos foram tomografadas nas dependências da Clínica de Radiologia Odontológica *Faciem 3D* (Anexo B). Os autores respeitaram os aspectos de biossegurança com o material biológico animal nas dependências da clínica. A análise por densidade de imagem foi realizada em todos os grupos.

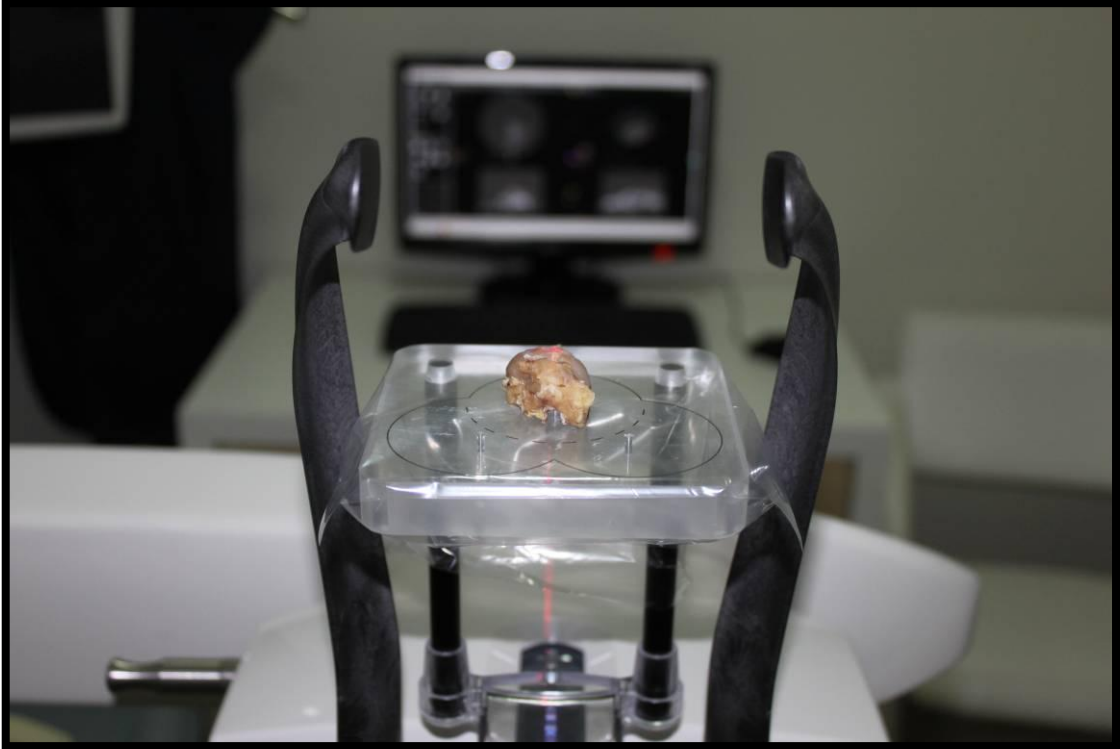
As imagens foram adquiridas através de um Tomógrafo Volumétrico *Kodak 9000 Carestream System*<sup>8</sup> com os seguintes parâmetros técnicos: tensão de pico de 60kVp, corrente de 4mA, tempo de exposição de 10,8s, tamanho do *voxel* de 75µm e área de aquisição da

---

<sup>8</sup> Carestream Health, Inc; Nova York, EUA.

imagem (FOV) de 50x38mm. Os espécimes foram posicionados para a aquisição das imagens de forma padronizada. O feixe guia luminoso passava pelo conduto auditivo externo seguindo até região anterior das narinas (Figura 09).

**Figura 09:** Padronização do posicionamento para aquisição das imagens tomográficas.



Fonte: Autora (2013).

As imagens foram adquiridas e armazenadas no protocolo *Digital Imaging and Communications in Medicine* (DICOM). As mesmas foram reconstruídas e analisadas no software livre *Image J*®, versão 1.46, para análise da densidade de imagem, relacionando os limites de atenuação dos feixes de raios X com os valores de níveis de cinza (NC) do tecido ósseo alveolar dos ratos.

Para a reconstrução e processamento no software *ImageJ*®, as imagens foram convertidas para 8 bits (256 níveis de cinza) gerando uma escala de 0 a 255 para cada imagem. O valor zero representou a menor atenuação e 255 a maior atenuação dos feixes de raios X.

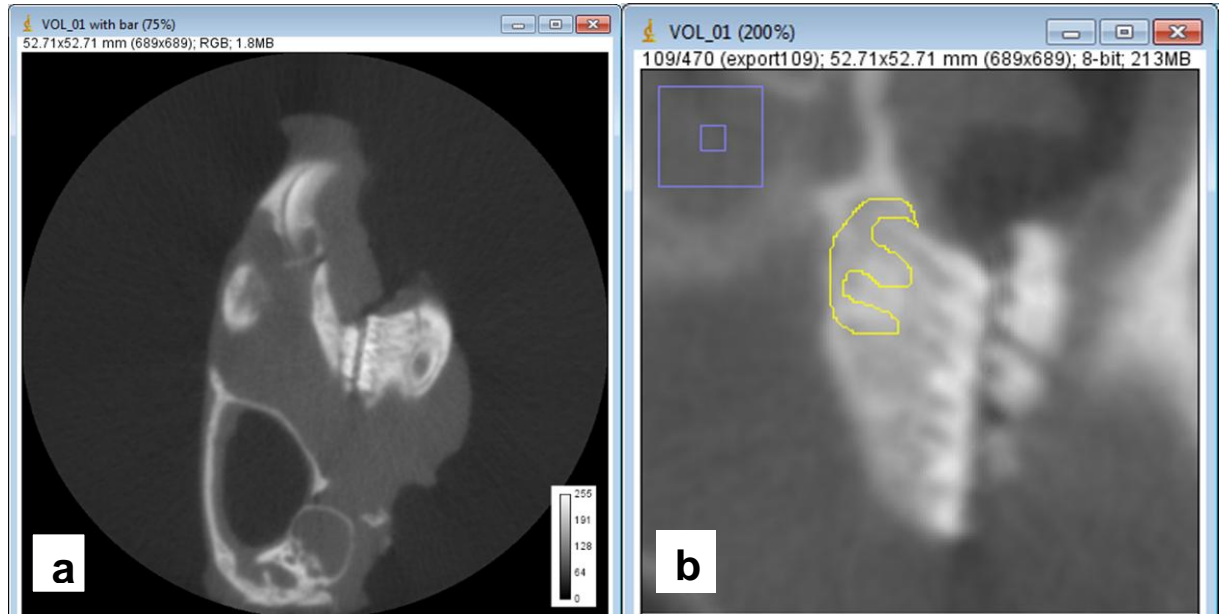
Como as imagens foram adquiridas em um processo volumétrico, para fins de determinação e limitação das regiões para análise, todas as sequências foram reconstruídas em seguimentos no software *ImageJ*® em plano sagital. Os volumes obtidos foram analisados

para seleção do corte que melhor exibía as regiões do primeiro molar superior e primeiro molar inferior para cada espécime.

Nos cortes previamente selecionados foram determinadas regiões de interesse (ROI "*Region of Interest*") para análise de níveis de cinza. Para a maxila, nos grupos GI e GII onde não houve intervenção cirúrgica, determinou-se a região correspondente ao tecido ósseo alveolar circundante as raízes do primeiro molar superior, idêntica e possuindo área de  $3,7\text{mm}^2$  para todos os espécimes desses grupos (Figura 10). Nos demais grupos GIII, GIV, GV, GVI a ROI foi determinada na região do alvéolo do primeiro molar superior e possuiu variação de medida de área para os espécimes em virtude da presença de raízes remanescentes, que foram contornadas e excluídas da análise.

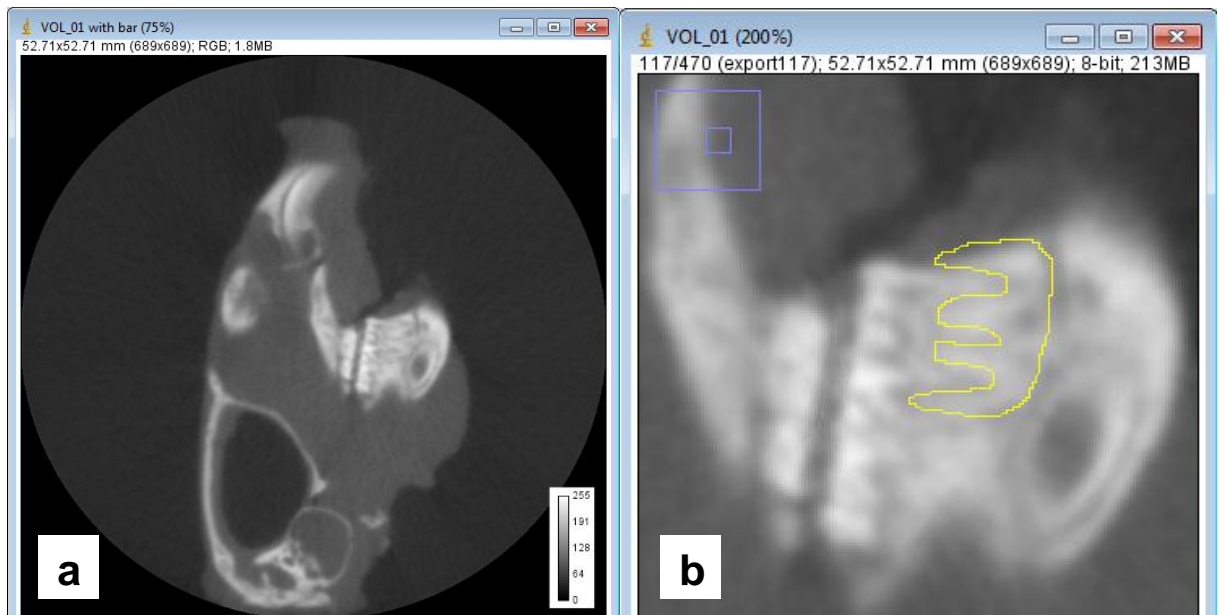
Na mandíbula a ROI selecionada incluiu o tecido ósseo alveolar circundante as raízes do primeiro molar inferior em todos os grupos, uma vez que estes permaneceram com as raízes, padronizando-se uma área de  $8,07\text{mm}^2$  (Figura 11).

**Figura 10:** a) Imagem tomográfica de corte sagital selecionado para visualização da área de análise da maxila, de um animal pertencente ao GI, visualização reduzida referente a 75% do tamanho natural. b) Em amarelo a delimitação da ROI para a maxila referente aos grupos GI e GII, em azul escala e localização do aumento em relação à imagem inicial, visualização aumentada referente a 200% do tamanho real.



Fonte: Autora (2013).

**Figura 11:** a) Imagem tomográfica de corte sagital selecionado para visualização da área de análise da mandíbula, de um animal pertencente ao GI, visualização reduzida referente a 75% do tamanho natural. b) Em amarelo a delimitação da ROI para mandíbula, em azul escala e localização do aumento em relação à imagem inicial, visualização aumentada referente a 200% do tamanho real.



Fonte: Autora (2013).

Todos os dados obtidos foram exportados, em forma de tabela, para o programa *Windows Excel® 2010*, a fim de se obter os dados gráficos das variações de densidade das unidades experimentais, em níveis de escala de cinza. As análises foram realizadas a partir dos valores adquiridos das imagens tomográficas de feixe cônico, sendo quantificadas e comparadas.

#### **4.11 Estudo Histológico**

O preparo das peças e a confecção das lâminas histológicas foram realizados na Unidade de Patologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O material em estudo foi descalcificado em solução de Ácido Nítrico<sup>9</sup> a 5% durante aproximadamente duas semanas. Posteriormente a região correspondente à maxila e mandíbula foi removida com auxílio de lâmina de bisturi nº15 e cabo nº3 e inserida e para processamento no plano sagital. As peças foram então desidratadas, em concentrações sucessivas de álcool (de 80% até 100%). Na sequência, o material recebeu processamento histológico de rotina e para inclusão em parafina. Foram realizados cortes em micrótomo, no sentido longitudinal do longo eixo dos blocos, com espessura de 5µm. As lâminas correspondentes aos hemicrânios lado esquerdo foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) e montadas com bálsamo de Canadá.

Para os grupos GI e GII foi realizada análise de densidade óssea, selecionou-se a região do tecido ósseo alveolar dos ápices distais dos primeiros molares superiores e inferiores. As imagens foram capturadas numa câmera<sup>10</sup> acoplada a um microscópio óptico<sup>11</sup> e um computador<sup>12</sup> utilizando o software Qcapture®<sup>13</sup>, com aumento de 200 vezes, utilizou-se o equivalente a uma lâmina para cada espécime. Para a aferição de densidade óssea, utilizou-se o programa *Adobe Photoshop CS3 extended* (versão 10.1). Por meio da ferramenta *Rectangular Marquee Tool* delimitou-se uma área padronizada de 1500pixel de comprimento por 1000pixel de largura, posicionada logo após o término da estrutura

---

<sup>9</sup> FM GOLD (Ácido Nítrico 100%) F.Maia Industria e Comércio Ltda, Cotia, SP, Brasil

<sup>10</sup> Olympus®, Qcolor 5, Coolet, RTV.

<sup>11</sup> Model Lambda LQT 2, ATTO Instruments Co., Hong Kong, China

<sup>12</sup> Dell®, Dimension 5150.

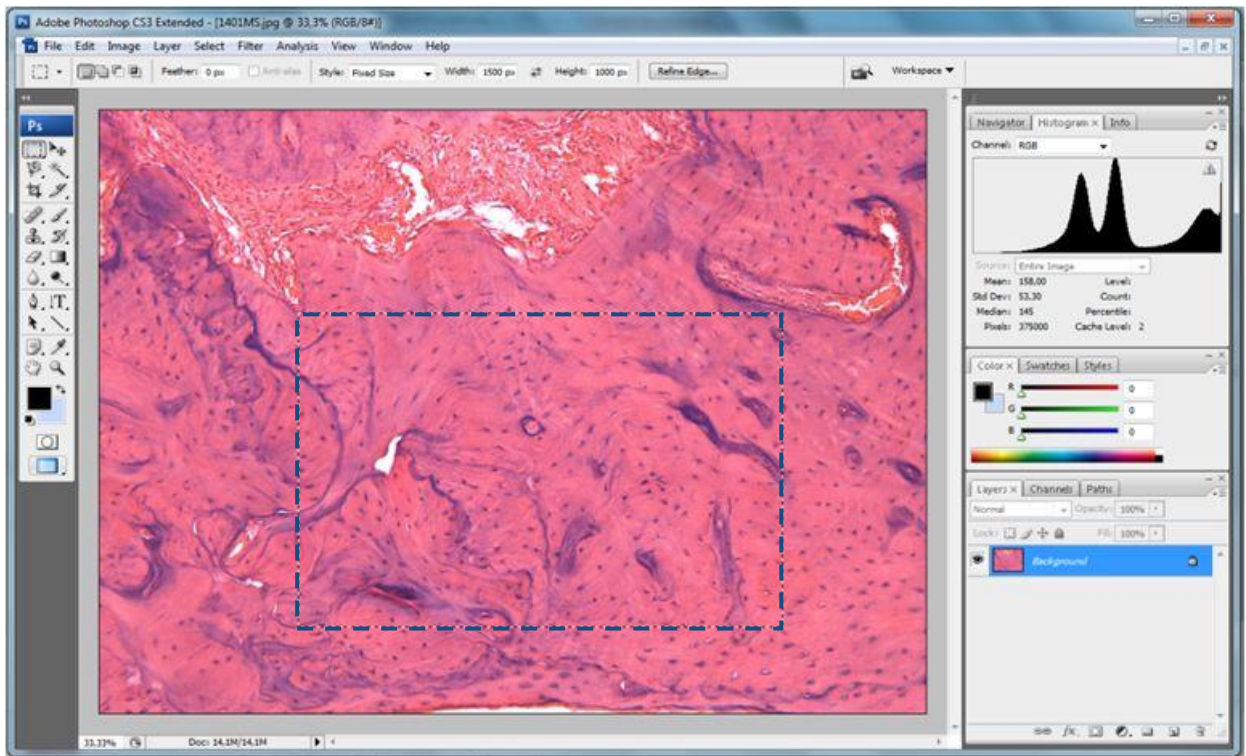
<sup>13</sup> Versão 2.81; Quantitative Imaging Corporatio, Inc.; 2005.



dentária e fibras periodontais (Figura 12), copiou-se a área selecionada para uma nova camada, esta região foi definida como a região de interesse para análise (Figura 13). Com o comando *magic tool*, calculado para uma tolerância de 25, selecionou-se dentro da região de interesse apenas a área de tecido mineralizado (TM) excluindo-se os espaços intertrabeculares e vasculares (Figura 14), está seleção foi copiada e colada em uma nova camada (Figura 15). O valor em pixel gerado para cada imagem foi transportado para o cálculo (de acordo com a fórmula a seguir) para ser convertido a um valor percentual:

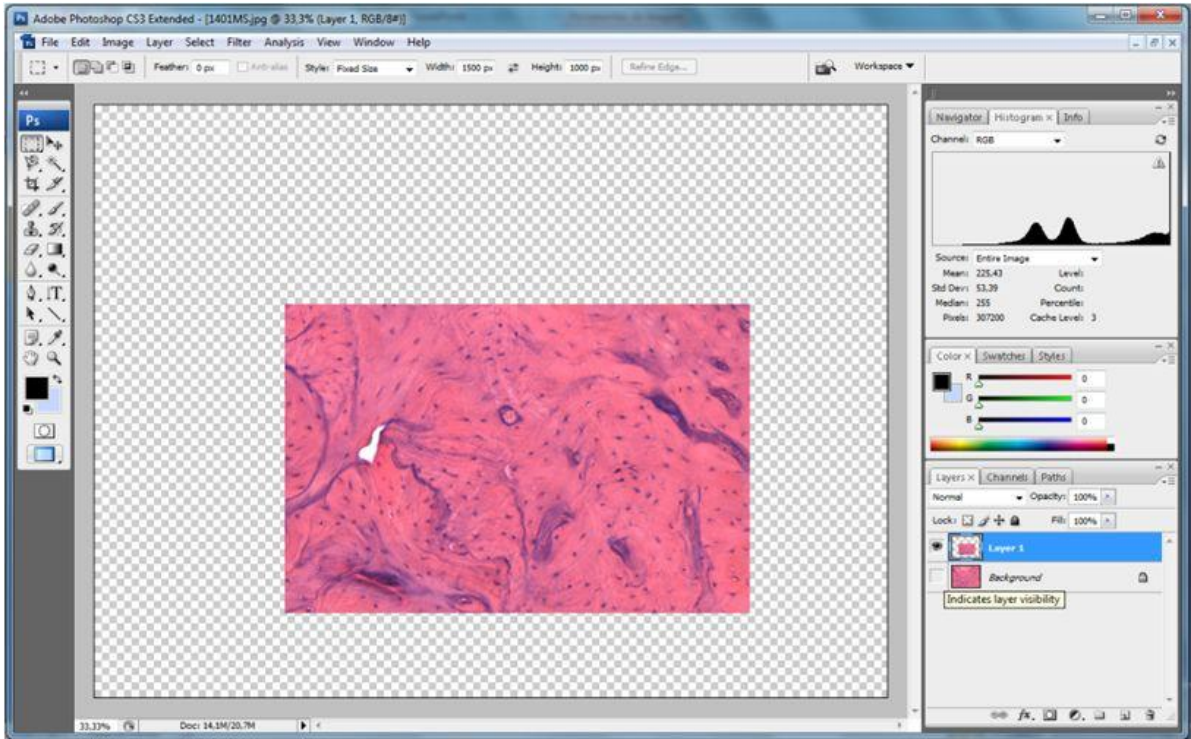
$$\text{TM} \times 100 / \text{Região de Interesse} = \% \text{ Tecido Mineralizado}$$

**Figura 12:** Imagem histológica da região apical distal do primeiro molar inferior esquerdo (GII) HE, 200x. a) Região de interesse delimitada pela área tracejada em azul.



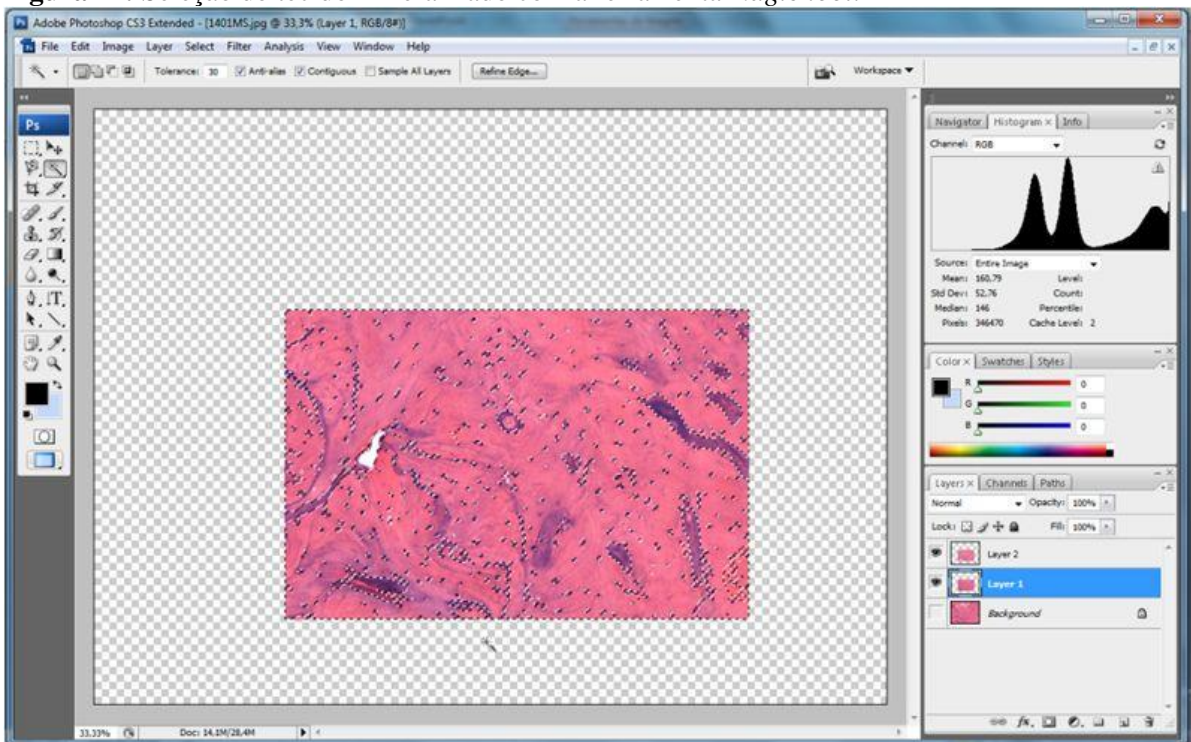
Fonte: Autora (2013).

**Figura 13:** Área selecionada transferida para novo plano.



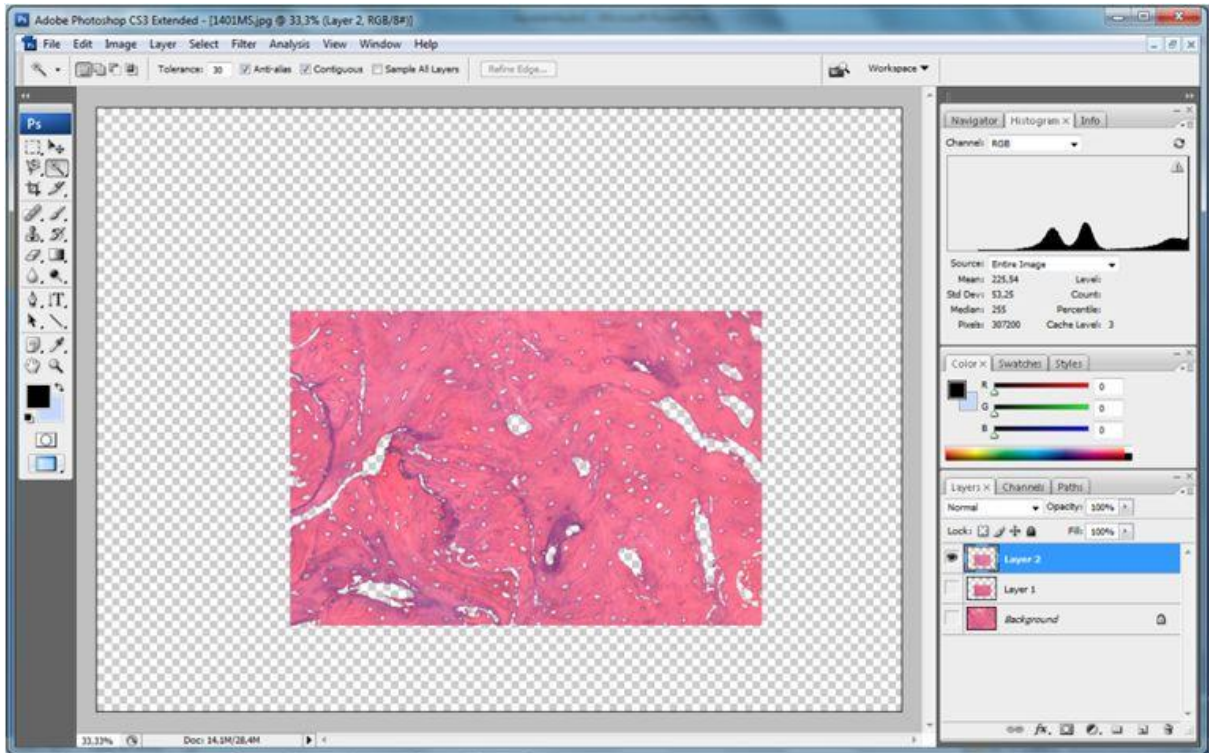
Fonte: Autora (2013).

**Figura 14:** Seleção do tecido mineralizado com a ferramenta *magic tool*.



Fonte: Autora (2013).

**Figura 15:** Área selecionada de tecido mineralizado.



Fonte: Autora (2013).

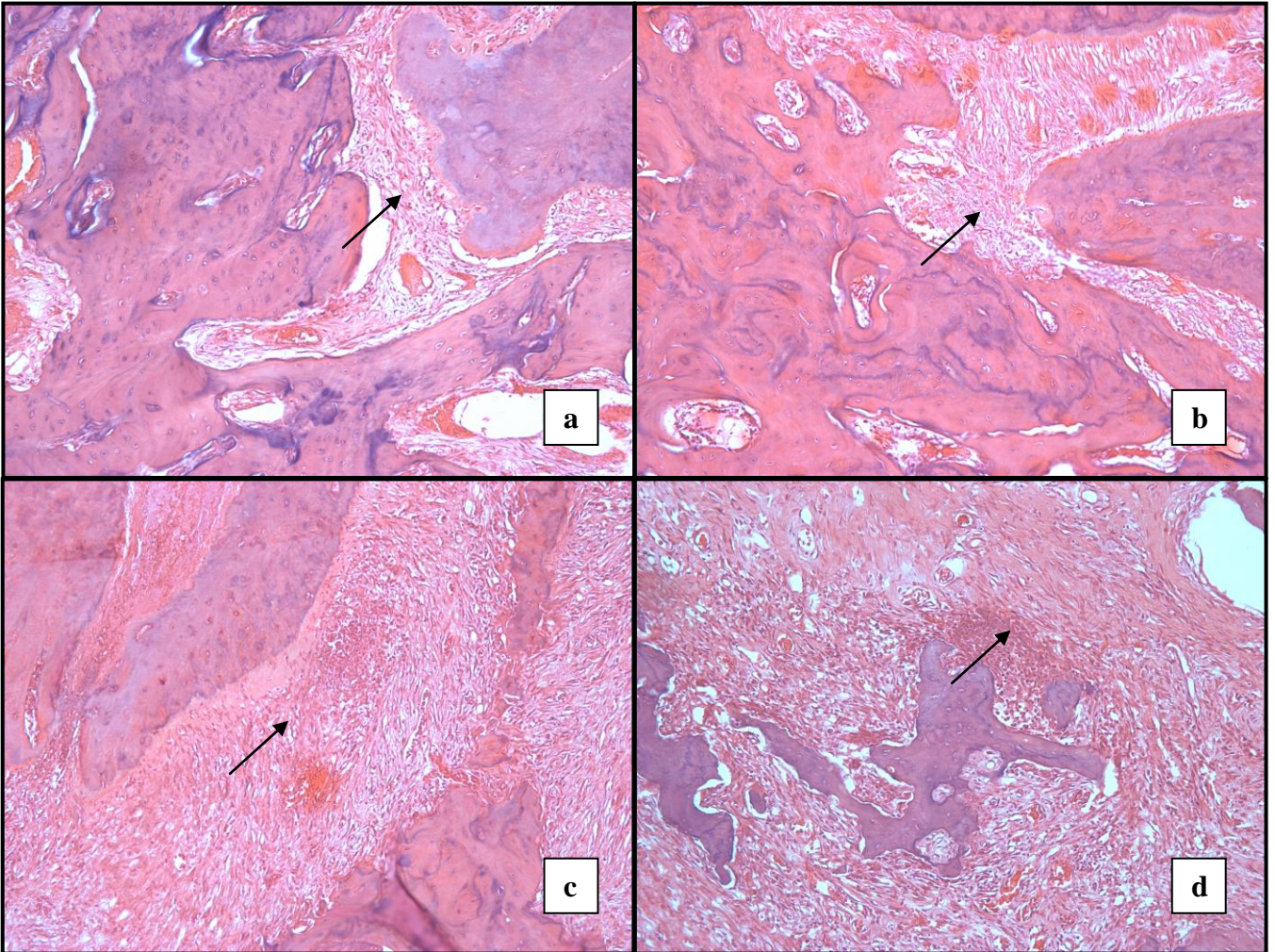
A leitura e interpretação das lâminas referentes aos grupos GIII, GIV, GV, GVI foram realizadas no Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDDB) na Universidade Federal de Pelotas (UFPel) supervisionadas pela Patologista Bucal Profa. Dra. Adriana Etges, utilizando-se um microscópio binocular *Olympus CX21 (modelo CX21FS1)*, com aumento de 40, 100 e 400 vezes. A região avaliada em maxila foi referente ao osso alveolar no sítio de realização da extração dentária do primeiro molar superior. Para mandíbula avaliou-se a região dos ápices dentários, estendendo-se até terço médio da raiz distal do primeiro molar inferior onde foi realizado o defeito sobre a coroa dentária, as lâminas histológicas que apresentavam raízes com deslocamento de posição ou ainda as que não contemplam a região de interesse foram desconsideradas. Foi realizada análise qualitativa, atribuindo-se escores, conforme protocolo de Sonis (2008), quanto à intensidade de infiltrado inflamatório, tipo de infiltrado, vascularização, presença de necrose óssea, neoformação óssea e reabsorção dentária para maxila e intensidade de infiltrado inflamatório, tipo de infiltrado, vascularização, presença de necrose óssea e reabsorção dentária para mandíbula.

Para análise de infiltrado inflamatório foram estabelecidos os seguintes escores (Figura 16): 0: Ausência;

1: Leve (predomínio no campo de 1-30%);

- 2: Moderado (predomínio no campo de 31-60%);  
 3: Intenso (predomínio no campo de mais de 60%).

**Figura 16:** Imagens histológicas de ápices radiculares referenciando a escala de escores para infiltrado inflamatório; a) Ausência de infiltrado inflamatório (→); b) Leve infiltrado Inflamatório (→); c) Moderado infiltrado inflamatório (→); d) Intenso Infiltrado Inflamatório (→). HE, 200x.



Fonte: Autora (2013).

Tipo de infiltrado inflamatório:

- 0: Agudo;  
 1: Crônico.

Para análise de vascularização do tecido ósseo alveolar foi determinada de acordo com a presença de estruturas com revestimento endotelial de acordo o domínio no campo:

- 0: Ausência;  
 1: Leve (predomínio no campo de 1-30%);

- 2: Moderado (predomínio no campo de 31-60%);
- 3: Intenso (predomínio no campo de mais de 60%).

Para estabelecimento dos escores de necrose óssea, neoformação óssea e reabsorção dentária foram estabelecidos os seguintes escores:

- 0: Ausente;
- 1: Presente.

Os dados obtidos em cada análise foram transferidos para tabelas. Todos esses valores foram transportados para o programa Microsoft Excel<sup>®</sup>, inseridos nas tabelas definitivas e submetidos à análise estatística.

#### **4.12 Análise Estatística**

A análise estatística deste trabalho foi realizada através de tabelas, gráficos e testes estatísticos, com o intuito de verificar se as diferenças entre os grupos com e sem uso de bisfosfonato, após consultoria técnica junto ao setor de Epidemiologia e Bioestatística do GPPG/HCPA/UFRGS.

Os programas que foram utilizados são: *software* estatístico *Statistical Package for Social Sciences*<sup>®</sup> (SPSS) versão 17.0 e a planilha eletrônica do *Microsoft Excel*<sup>®</sup>, ambos para o sistema operacional Windows<sup>®</sup>.

Para os valores obtidos através das análises densidade de níveis de cinza e densidade óssea na estrutura alveolar, inicialmente aplicou-se o teste de Shapiro-Wilk para identificar normalidade de distribuição de valores da amostra. Quando a distribuição dos dados apresentava-se normal foi aplicado o Teste T e para comparação entre os grupos, se a distribuição apresentava-se anormal utilizou-se ainda o Teste não-paramétrico Kruskal Wallis ambos com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Para os dados referentes a escores foi aplicado o teste qui-quadrado no intuito de verificar existência de associação das variáveis com os grupos, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### **4.13 Descarte de Materiais**

Os resíduos em geral tiveram segregação e adequação aos coletores próprios. O descarte de resíduos químicos foi feito seguindo as normas do Plano de Gerenciamento de

Resíduos (PGR). Os mesmos foram gerados de forma segura, sendo coletados, acondicionados, identificados e transportados conforme normas da COSAT (Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho), que preveem recipientes apropriados para descartes, identificados pela data inicial do envase, pH final, laboratório de origem, nome dos responsáveis legal, tipo de resíduo químico sólido ou líquido, assim como a descrição de sua constituição. Os materiais recolhidos foram encaminhados ao Instituto de Química da UFRGS, que destina os resíduos para descarte ou reciclagem dos materiais.

Os restos dos animais de experimentação foram acondicionados em plásticos brancos identificados e armazenados em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  específico da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, até o recolhimento semanal pelo setor de coleta especial para animais conforme normas do HCPA.

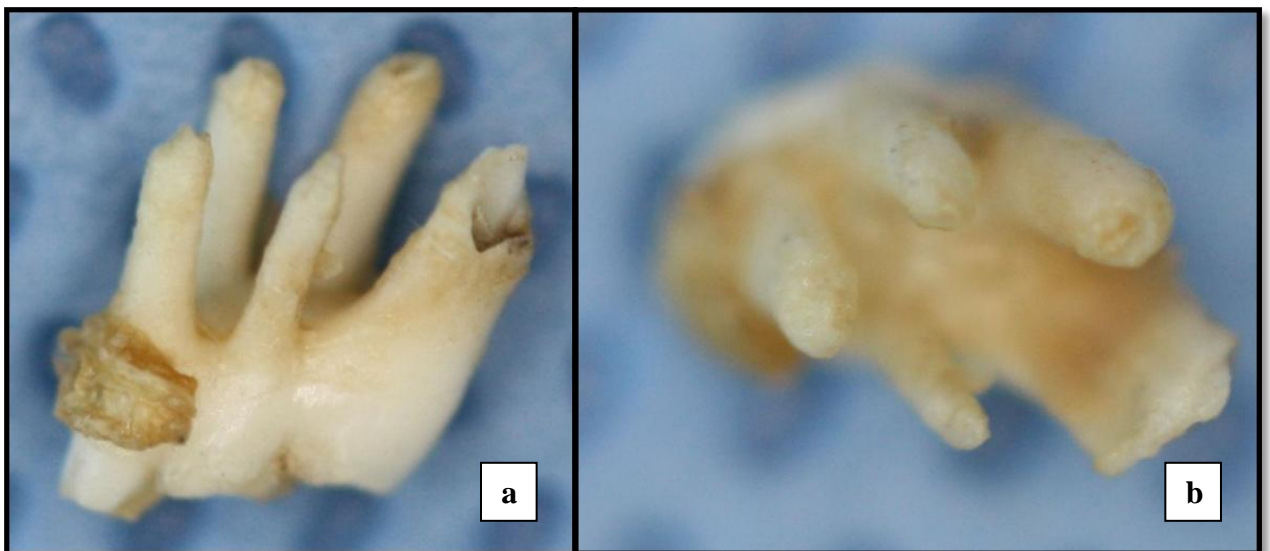
As seringas e agulhas foram armazenadas em caixas específicas, adequadas para material cortante, identificadas e pertencentes a da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, para posterior recolhimento quinzenal pelo setor de coleta especial. Os rejeitos tóxicos foram separados em locais específicos e adequados para posterior recolhimento quinzenal pelo setor de coleta especial.

## 5 RESULTADOS

Durante o período experimental ocorreu à morte do animal n° 21, pertencente ao grupo GIV, após indução anestésica previamente a realização do procedimento cirúrgico, por conseguinte este animal foi excluído da amostra.

O procedimento de extração dentária do primeiro molar superior apresentou fratura de ápice radicular em grande parte da amostra, uma vez que a anatomia dental mostra-se complexa com a presença de cinco raízes divergentes, apresentando uma raiz em posição intermediária bastante delgada (Figura 17).

**Figura 17:** Vista aproximada do primeiro molar superior do rato. a) Vista sagital; b) Vista dos ápices radiculares.



Fonte: Autora

### 5.1 Efeito do Ácido Zoledrônico sobre o Tecido Ósseo Alveolar

Realizou-se a comparação entre os grupos teste (GII) e controle (GI) para avaliação da influência do Ácido Zoledrônico sobre o tecido ósseo alveolar de ratos.

### 5.1.1 RESULTADO DA ANÁLISE TOMOGRÁFICA: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS GI E GII

Os dados referentes aos valores de níveis de cinza para maxila e mandíbula estão dispostos integralmente nos apêndices A e B, respectivamente.

Para a região da maxila a avaliação tomográfica não apontou diferenças significativas quanto as variáveis (valor máximo NC, valor mínimo NC, mediana NC e média NC) entre os grupos teste (GII) e controle (GI) conforme tabela 01 ( $p > 0,05$ ). Os dados estão ilustrados no gráfico 01 de comparação de médias de níveis de cinza.

Quanto à região da mandíbula os resultados mostraram uma tendência a maior densidade de imagem para o grupo que recebeu a medicação (GII) comparada com o grupo controle (GI), observada pelo gráfico 01 de médias de níveis de cinza. Contudo, os dados não apresentaram significância estatística. (Tabela 01).

**Tabela 01:** Comparação entre os grupos GI e GII quando as avaliações de níveis de cinza (NC) para maxila e mandíbula.

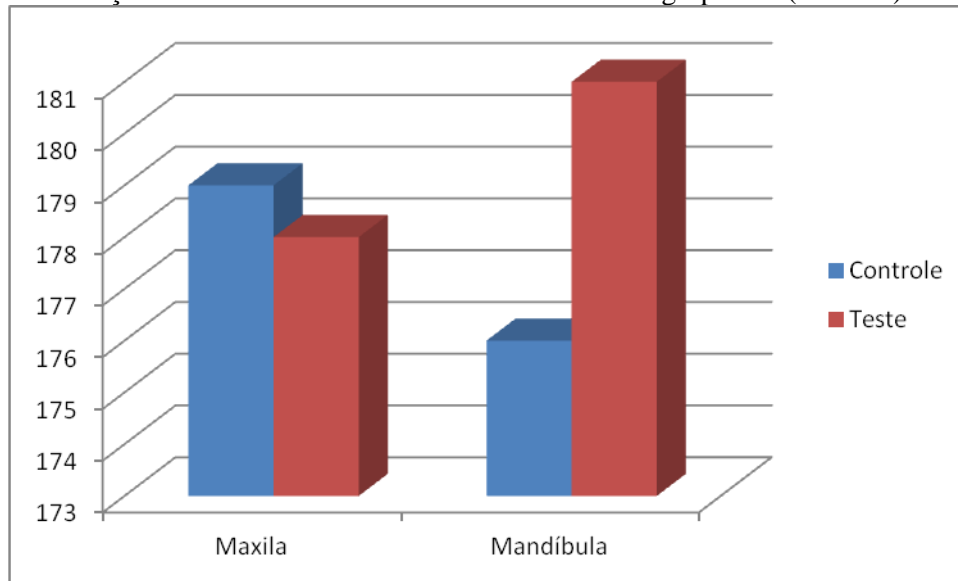
Região	Dado Analisado	Média (Desvio Padrão)	<i>p</i>
<b>GI X GII</b>			
	Média de NC	179 (7) X 178(10)	0,902
<b>Maxila</b>	Valor Máximo NC	203 (7,1) X 204 (8,2)	0,866
	Valor Mínimo NC	135 (8,5) X 133 (18,2)	0,797
	Mediana	180 ( 7,9) X 181 (10,4)	0,821
	Média de NC	176 (6,2) X 181 (9,2)	0,321
<b>Mandíbula</b>	Valor Máximo NC	207 (4,6) X 210 (4,6)	0,174
	Valor Mínimo NC	94 (18,2) X 105 (15,8)	0,282
	Mediana	182 (4,8) X 186 (7,1)	0,275

Nível de significância de 5%.

Fonte: Elaborado pela autora (2013).



**Gráfico 01:** Variação entre as médias de níveis de cinza entre os grupos GI (controle) e GII (teste).



Fonte: Elaborado pela Autora (2013).

### 5.1.2 RESULTADO DA ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS GI E GII

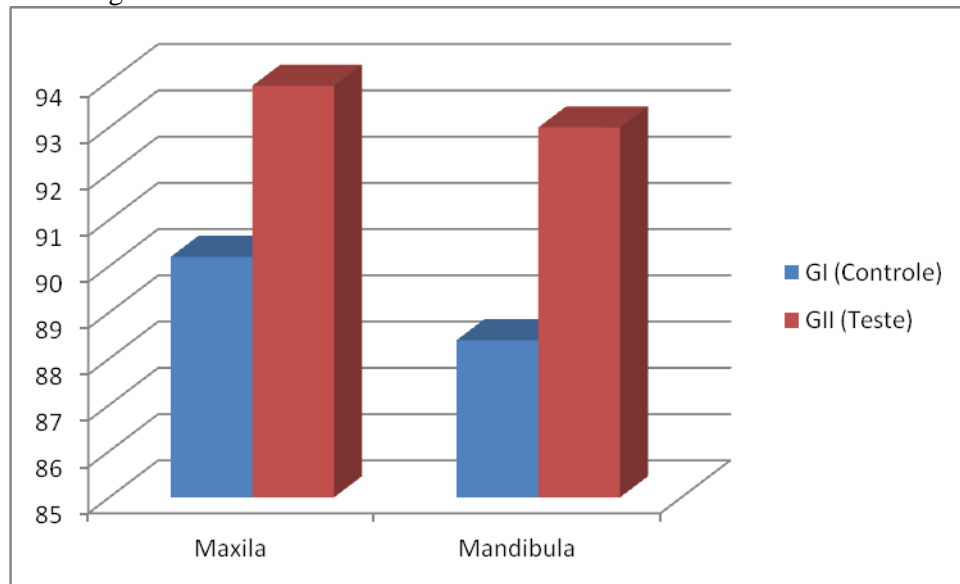
Os resultados da avaliação de densidade óssea alveolar encontram-se expressos integralmente no Apêndice C, em dados tabelados com valores percentuais. Para região de maxila a média de percentual de densidade óssea para o grupo GI (controle) foi de 90,2% com um desvio padrão de 4,9 e uma média de 93,9% para o grupo GII (teste) e desvio padrão de 2,8%, os dados não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos teste (GII) e controle (GI).

A região de mandíbula manteve-se com resultados semelhantes aos encontrados na região de maxila. A média de densidade óssea para o grupo GI foi de 88,4% com desvio padrão de 6,1, enquanto que o grupo GII a média permaneceu em 93% com desvio padrão de 3,9. Submetidos ao teste estatístico não apontaram diferenças entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

O gráfico 02 demonstra as diferenças entre os grupos em ambas as regiões maxila e mandíbula para análise quantitativa de densidade óssea.

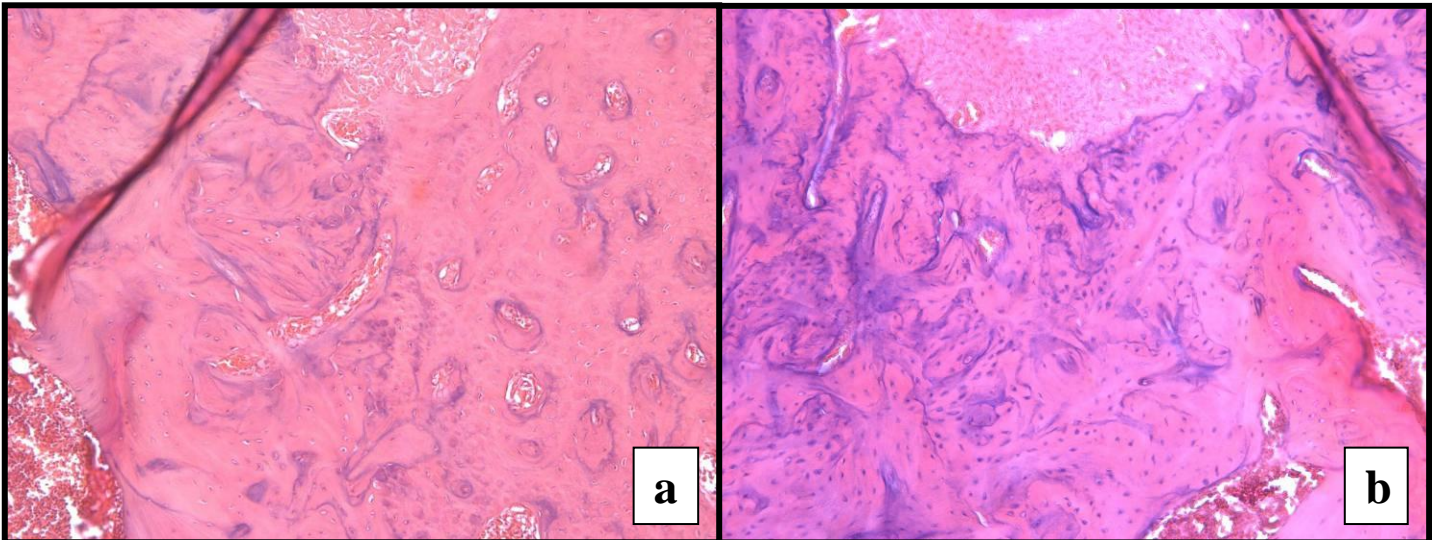
Quanto à análise descritiva, os espécimes pertencentes ao grupo GII apresentaram tecido ósseo alveolar mais compacto, com aspecto “marmorizado”. Esta característica representa um aumento considerável da densidade, quando comparado ao grupo controle (GI) (Figura 18).

**Gráfico 01:** Mostra as diferenças entre as médias de percentual de tecido mineralizado entre os grupos GI e GII nas regiões de análise maxila e mandíbula.



Fonte: Elaborado pela autora. (2013).

**Figura 18:** Imagens histológicas do ápice radicular do primeiro molar inferior esquerdo, em HE, 200x. a) Tecido ósseo alveolar bastante vascularizado com características de normalidade, GI (controle); b) Tecido ósseo alveolar alterado, observa-se compactação óssea de característica “marmorizada”, com diminuição dos espaços de nutrição do tecido ósseo, GII (teste).



Fonte: Autora (2013).

## **5.2 Efeito do Ácido Zoledrônico sobre o Tecido Ósseo Alveolar após Exodontia e DCCD em Três Semanas de Terapia.**

Realizou-se a comparação entre os grupos teste (GIV) e controle (GIII) para avaliação da influência do Ácido Zoledrônico no processo de reparo ósseo alveolar e resposta inflamatória de animais submetidos à terapia por um período de três semanas, prévio aos procedimentos de exodontia e DCCD.

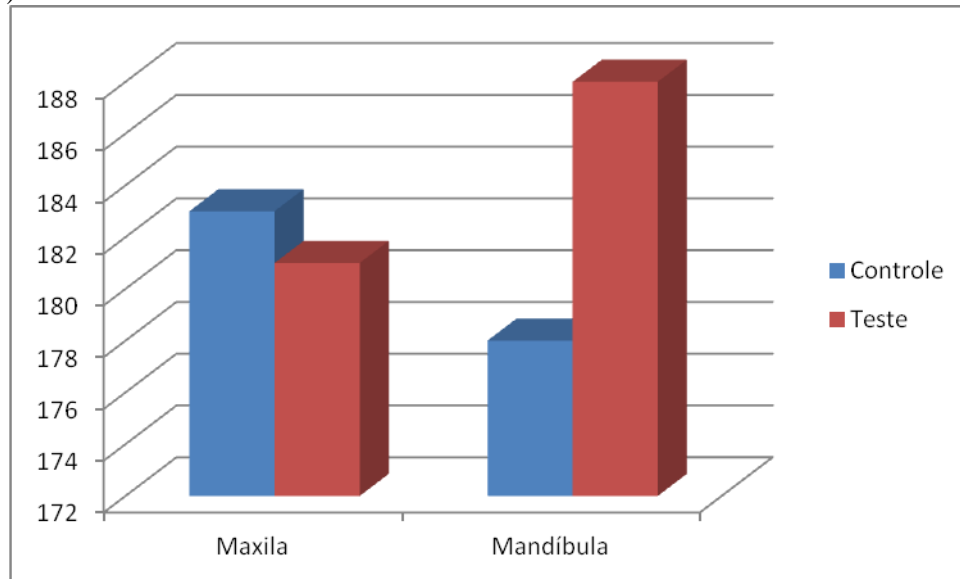
### **5.2.1 RESULTADO DA ANÁLISE TOMOGRÁFICA: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS GIII E GIV**

Os dados referentes aos valores de níveis de cinza para maxila e mandíbula estão dispostos integralmente nos Apêndices A e B, respectivamente.

Para região da maxila o gráfico 03 aponta as diferenças entre os grupos quanto às médias de níveis de cinza, observa-se que o grupo teste (GIV) obteve média menor se comparado ao grupo controle (GIII), a tabela 02 demonstra que apesar das diferenças encontradas no gráfico os resultados não foram estatisticamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

A região da mandíbula exhibe dados inversos à região da maxila, os valores demonstram a diferença encontrada entre o grupo (GIV) comparado com o grupo controle (GIII), que pode ser observada pelo gráfico 03 de médias de níveis de cinza, onde a maior densidade de imagem esteve associada ao grupo GIV. Os dados apontam diferenças estatísticas com  $p < 0,05$  para as variáveis : média ( $p = 0,02$ ), valor mínimo ( $p = 0,036$ ) e valor máximo ( $p = 0,01$ ) (Tabela 02).

**Gráfico 02:** Variação entre as médias de níveis de cinza entre os grupos GIII (Controle) e GIV (Teste).



Fonte: Elaborado pela autora. (2013).

**Tabela 02:** Comparação entre os grupos GIII e GIV quando as avaliações de níveis de cinza para maxila e mandíbula.

Região	Dado Analisado	Média (Desvio Padrão)	P
<b>GIII X GIV</b>			
<b>Maxila</b>	Média de NC	183 (6,8) X 178 (8)	0,332
	Valor Máximo NC	206 (4,5) X 201 (9,8)	0,269
	Valor Mínimo NC	125 (14,1) X 129 (7,7)	0,52
	Mediana	187 (6,4) X 182 (8,8)	0,256
<b>Mandíbula</b>	Média de NC	181 (6,2) X 188 (2,6)	0,02*
	Valor Máximo NC	208 (3,9) X 214 (4,5)	0,036*
	Valor Mínimo NC	99 (7) X 118 (12,8)	0,010*
	Mediana	187 (6,1) X 192 (2,7)	0,98

Nível de significância de 5% (\*)

Fonte: Elaborado pela autora (2013).

## 5.2.2 RESULTADO DO ESTUDO HISTOLÓGICO: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS GIII E GIV

Os escores atribuídos aos grupos GIII e GIV, para maxila encontram-se tabelados no Apêndice D e os dados referentes à mandíbula no Apêndice E. Segundo análise estatística não se encontrou associação entre as variáveis na comparação entre os dois grupos.

### 5.2.2.1 Análise Maxilar

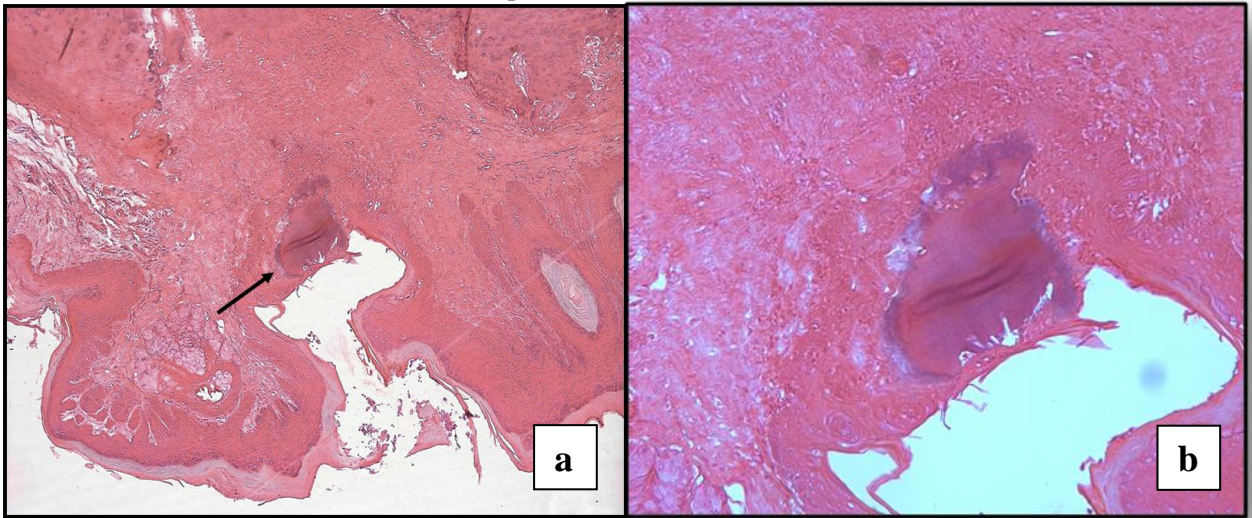
Para a região de maxila os grupos foram comparados quanto ao reparo ósseo alveolar após exodontia. Para análise de presença de infiltrado inflamatório o grupo controle GIII (n=6) apresentou apenas um espécime com leve infiltrado inflamatório crônico na região de primeiro molar superior. Enquanto que no grupo teste GIV (n=7) apenas um animal evidenciou presença de infiltrado inflamatório moderado crônico.

Quanto a variável vascularização o grupo controle (GIII) apresentou 83% (5/6) da amostra com vascularização moderada e 17% (1/6) com vascularização leve. O grupo teste (GIV) obteve 71% de vascularização moderada (5/7) e 29% (2/7) de vascularização leve.

Todos os animais apresentaram neoformação óssea e reabsorção de raízes remanescentes no local da extração dentária. Nenhum espécime nesses grupos (GIII e GIV) apresentou necrose óssea.

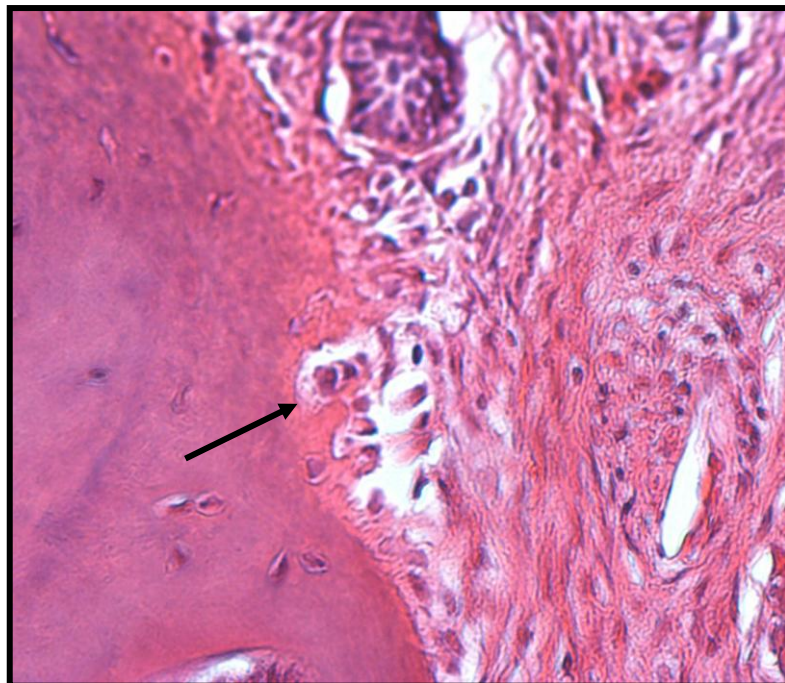
Na análise descritiva histológica pôde-se observar que os animais pertencentes aos grupos teste (GIV) exibiram uma quantidade de tecido conjuntivo fibroso relativamente maior se comparados ao grupo controle (GIII). Este tecido apresentava-se invaginado sobre o alvéolo dental, em consequência, ocorreu uma diminuição de tecido ósseo neoformado (Figura 19). Pode-se observar ainda presença diminuída de células de origem reabsortiva, condição presente no grupo controle como ilustra a figura 20.

**Figura 19:** Imagem histológica de um espécime pertencente ao grupo GIV. a) Presença do remanescente dentário em processo de reabsorção, envolvido por tecido conjuntivo fibroso ( → ). HE, 40x. b) Remanescente dentário visão aproximada. HE, 200x.



Fonte: Autora (2013)

**Figura 20:** Imagem histológica de um espécime pertencente ao grupo GIII (controle). Observa-se presença de uma célula gigante multinucleada na proximidade do remanescente dentário ( → ). HE, 400x.



Fonte: Autora (2013).

### 5.2.2.2 Análise Mandibular

Para a região da mandíbula os grupos foram comparados quanto à resposta inflamatória após defeito com broca na coroa dentária do primeiro molar inferior.

A análise de presença de infiltrado inflamatório apontou para o grupo controle (GIII) (n=5) um percentual de 20% (1/5) de presença de leve infiltrado inflamatório crônico e 20% (1/5) de moderado infiltrado inflamatório agudo, 60 % (3/5) não apresentaram presença de infiltrado inflamatório no ápice radicular. Para o grupo teste GIV (n=7) apenas 14% (1/7) da amostra apresentou infiltrado inflamatório de origem crônica, os demais 86% (6/7) não apresentaram alterações de origem inflamatória no ápice radicular distal.

A variável vascularização apresentou para o grupo controle (GIII) 60% (3/5) da amostra com vascularização moderada e 40% (2/5) com vascularização intensa. O grupo teste (GIV) apresentou 86% da amostra com vascularização moderada (6/7) e 14% (1/7) com vascularização leve.

Não houve necrose óssea em nenhum dos espécimes avaliados na região de interesse. Quanto a variável reabsorção dentária apenas um animal de cada grupo controle (GIII) e teste (GIV) exibiu tal alteração.

A análise descritiva histológica, no grupo controle (GIII) revelou uma reação vascular mais exacerbada quando comparada ao grupo teste (GIV). O tecido ósseo alveolar do grupo teste (GIV) mostrou-se mais compacto, exibindo menor presença de estruturas vasculares e zonas de nutrição, nas regiões onde não há reação inflamatória.

## **5.3 Efeito do Ácido Zoledrônico sobre o Tecido Ósseo Alveolar após Exodontia e DCCD em Oito Semanas de Terapia.**

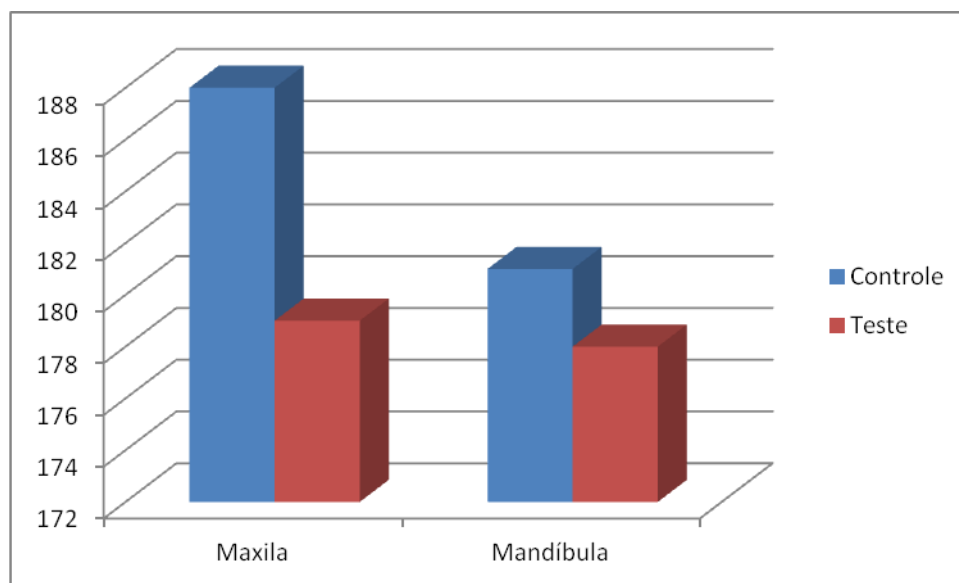
Realizou-se a comparação entre os grupos teste (GVI) e controle (GV) para avaliação da influência do Ácido Zoledrônico no processo de reparo ósseo alveolar e resposta inflamatória de animais submetidos à extração dentária e DCCB, em terapia por um período de oito semanas.

### 5.2.3 RESULTADO DA ANÁLISE TOMOGRÁFICA: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS GV E GVI.

A análise tomográfica referente à área de maxila evidenciou diferenças entre os grupos que realizaram e que não realizaram terapia. O grupo controle (GV) permaneceu com média de níveis de cinza mais elevada comparado ao grupo teste (GVI) de acordo com o gráfico 04. Os dados demonstraram diferenças significantes em análise estatística com  $p < 0,05$  na variável valor mínimo de NC ( $p = 0,02$ ) e uma forte tendência na variável média de NC ( $p = 0,053$ ). (Figura 21).

Com relação à região mandibular, entre as variáveis (valor máximo NC, valor mínimo NC, mediana NC e média NC) com os grupos controle (GV) e teste (GVI) não demonstraram diferenças estatísticas (Tabela 03). No entanto, o gráfico 04 exibe uma pequena diferença entre os grupos com média de NC menor para o grupo teste (GVI) que esteve em terapia prolongada de Ácido Zoledrônico.

**Gráfico 03:** Demonstra as diferenças entre as médias de percentual de níveis de cinza entre os grupos GV (controle) e GVI (teste) nas regiões de análise maxila e mandíbula.



Fonte: Elaborado pela autora (2013).



**Tabela 03:** Comparação entre os grupos GV e GVI quando as avaliações de níveis de cinza para maxila e mandíbula.

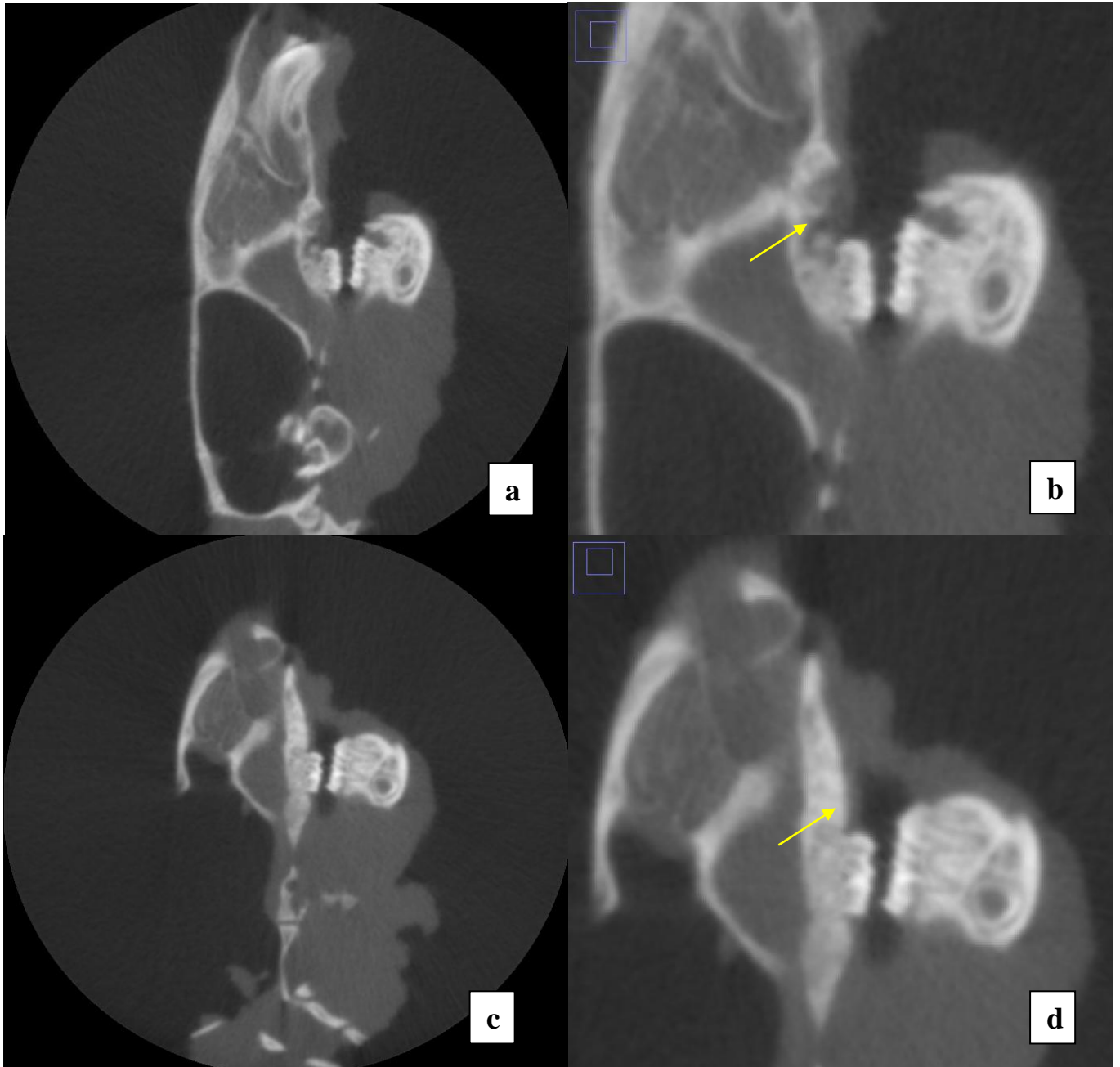
<b>Região</b>	<b>Dado Analisado</b>	<b>Média (Desvio Padrão)</b>	<b>P</b>
<b>GV X GVI</b>			
	Média de NC	188 (4) X 179 (9,9)	0,053<
<b>Maxila</b>	Valor Máximo NC	206 (8,7) X 202 (6,2)	0,362
	Valor Mínimo NC	140 (6,90 X 128 (10,4)	0,02*
	Mediana	188 (9,1) X 181 (10)	0,206
<b>Mandíbula</b>			
	Média de NC	181 (7,7) X 178 (5,7)	0,459
	Valor Máximo NC	212 (2,5) X 210 (5,1)	0,384
	Valor Mínimo NC	115 (11,8) X 107 (7,7)	153
	Mediana	186 (8,1) X 182,2(4,8)	0,36

Nível de significância de 5% (\*)

Tendência à significância (<)

Fonte: Elaborado pela autora (2013).

**Figura 21:** a) Imagem tomográfica do hemicrânio do grupo teste (GVI), em corte sagital na proporção de 1:1; b) Imagem em aumento de 200% da região alveolar de maxila e mandíbula observa-se região hipodensa em maxila(→), compatível com defeito ósseo após extração em animal do grupo teste (GVI); c) Imagem tomográfica do hemicrânio do grupo controle (GV) em corte sagital na proporção de 1:1; d) Imagem em aumento de 200% da região alveolar de maxila e mandíbula observa-se em maxila raízes residuais cobertas por tecido ósseo remodelado (→) de um animal do grupo controle (GV).



Fonte: Autora (2013).

#### 5.2.4 RESULTADO DO ESTUDO HISTOLÓGICO: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS GV E GVI

Os escores atribuídos aos grupos teste (GVI) e controle (GV), para maxila encontram-se tabelados no Apêndice D e os dados referentes à mandíbula no Apêndice E. Segundo análise estatística, não se encontrou associação entre das nenhuma das variáveis e os grupos teste (GVI) e controle (GV).

#### 5.2.4.1 Análise Maxilar

Para a região de maxila os grupos foram comparados quanto ao reparo ósseo alveolar após exodontia. No grupo controle (GV) foi observado apenas em um espécime leve infiltrado inflamatório crônico (1/7). Já no grupo teste (GVI), um espécime apresentou presença de intenso infiltrado inflamatório agudo.

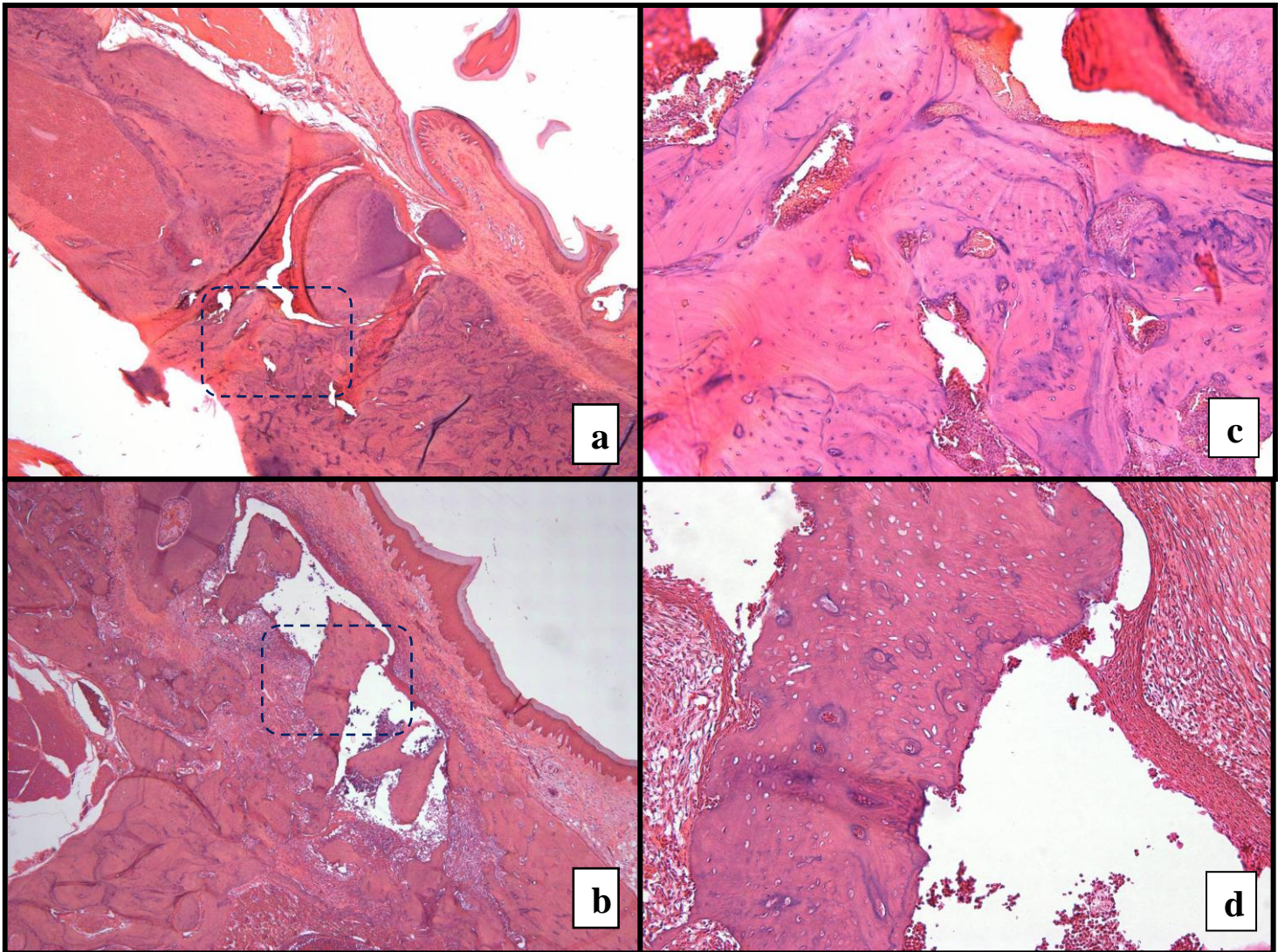
Considerando a vascularização observou-se que o grupo controle (GV) apresentou 43% (3/7) da amostra com vascularização moderada e 57% (4/7) com vascularização leve. O grupo teste (GVI) revelou 14% de vascularização leve (1/7), 72% de vascularização moderada (5/7) e 14% de vascularização intensa (1/7).

Necrose óssea esteve presente em um animal do grupo teste (GVI).

Em ambos os grupos controle (GV) e teste (GVI) os animais apresentaram neoformação óssea. A reabsorção de raízes remanescentes no grupo controle (GV) foi de 83% (1/6), e de 100% no grupo teste (GVI).

Na análise descritiva histológica pode-se observar que os animais pertencentes ao grupo teste (GVI) demonstraram neoformação óssea diminuída. A reabsorção e a substituição do tecido dentário remanescente foram maiores quando comparadas ao grupo controle (GV). A figura 22 exemplifica o grupo controle (GV) e o grupo teste (GVI). No grupo teste (GVI) há presença de remanescentes dentários e osso necrótico associado à inflamação aguda, caracterizando um processo de osteonecrose.

**Figura 22:** a) Imagem histológica da região de primeiro molar superior esquerdo do grupo controle (GV). Observa-se remanescente dentário circundado por tecido em processo de neoformação óssea (área delimitada por tracejado azul). HE, 40x; b) Imagem da zona adjacente ao remanescente dentário ilustrando neoformação óssea em espécime do grupo GV. HE, 100x; c) Imagem histológica da região de primeiro molar superior esquerdo do grupo GVI. Observa-se área de necrose óssea (área delimitada por tracejado azul). HE, 40x; d) Imagem ilustrando osso necrótico em maior detalhe em animal do grupo GVI. HE, 100x.



Fonte: Autora (2013).

#### 5.2.4.2 Análise Mandibular

Para a região da mandíbula os grupos foram comparados quanto à resposta inflamatória após defeito com broca na coroa dentária do primeiro molar inferior.

O grupo controle GV evidenciou apenas um espécime com presença de leve

infiltrado inflamatório crônico 25% (1/4), os demais não apresentaram infiltrado inflamatório 75% (3/4). O grupo teste GVI apresentou intenso infiltrado inflamatório agudo 60% (3/5) e os demais 40% (2/5) ausência de processo inflamatório.

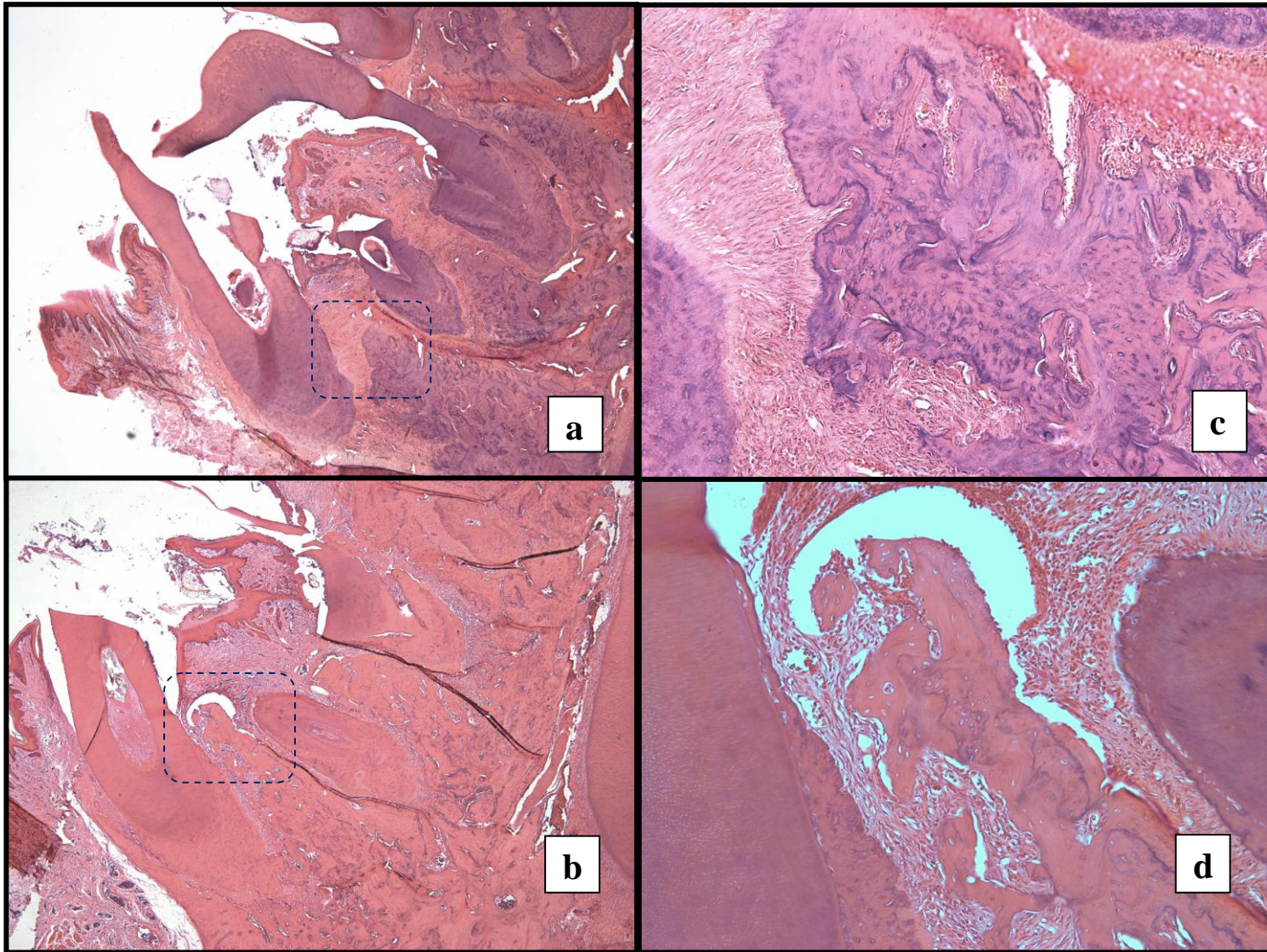
Tratando-se da vascularização, o grupo controle (GV) apresentou vascularização moderada em 80% (3/4) e vascularização leve em 20% (1/4). No grupo teste (GVI) foi observada vascularização moderada (n=5).

Necrose óssea foi observada em dois espécimes do grupo teste (GVI). Esta condição não foi observada no grupo controle (GV).

A reabsorção dentária esteve presente em 80% (4/5) da amostra do grupo teste (GVI) em comparação a 25% (1/4) da amostra do grupo controle (GV).

Na análise descritiva observou-se em alguns espécimes do grupo teste (GVI) zonas intensas de fibrose e áreas de necrose associadas a processo inflamatório agudo próximo a região de furca, frequentemente fraturada. A figura 23 mostra a região do primeiro molar inferior onde foi realizado defeito com broca sobre a coroa dentária nos grupos controle (GV) e teste (GVI). Observa-se que nas imagens pertencentes ao grupo controle (GV) há presença de tecido fibroso e inflamação crônica associada. O grupo teste (GVI) apresentou reabsorção do tecido ósseo interradicular e consequente processo de substituição, revelou ainda um processo lento de reabsorção e remodelamento ósseo da zona interradicular.

**Figura 23:** a) Imagem histológica da região de primeiro molar inferior esquerdo do grupo controle (GV). Observa-se áreas de reabsorção e neoformação do tecido ósseo interradicular (área delimitada por tracejado azul). HE, 40x; b) Imagem da zona interradicular em processo de remodelação óssea em espécime do grupo GV. HE, 100x; c) Imagem histológica da região de primeiro molar inferior esquerdo do grupo GVI. Observa-se tecido ósseo circundado por intenso infiltrado inflamatório agudo encapsulando área de osso interradicular (área delimitada por tracejado azul). HE, 40x; d) Imagem ilustrando tecido ósseo sendo reabsorvido sem neoformação em animal do grupo GVI. HE, 100x.



Fonte: Autora (2013).

### **5.3 Efeito do Prolongamento da Terapia com Ácido Zoledrônico sobre o Tecido Ósseo Alveolar após Exodontia e DCCD.**

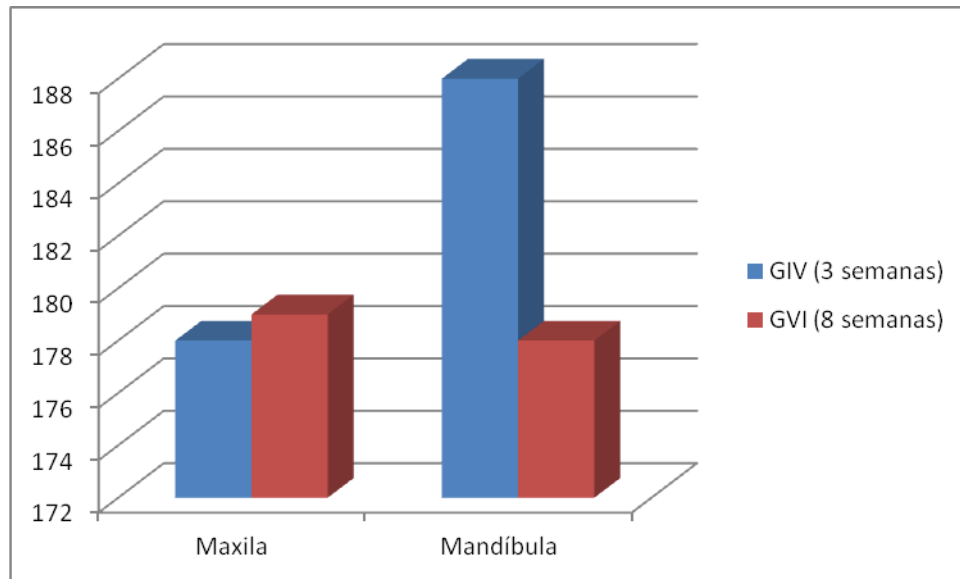
Realizou-se a comparação entre os grupos GIV e GVI para avaliação da influência do tempo de tratamento com Ácido Zoledrônico no processo de reparo ósseo alveolar e processo inflamatório após procedimentos de exodontia e DCCD. Para tanto se comparou o grupo GIV com o grupo GVI, onde o tempo de tratamento foi de três e oito semanas respectivamente.

#### **5.3.1 RESULTADO DA ANÁLISE TOMOGRÁFICA: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS GV E GVI.**

A análise dos dados para região de maxila não evidenciou diferenças estatísticas entre os grupos GIV e GVI, segundo a tabela 04.

Quanto à análise da região do primeiro molar inferior esquerdo, onde se realizou o DCCD, os resultados revelam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ), o que pode ser visualizado no gráfico 05. O grupo que realizou tratamento prolongado com Ácido Zoledrônico (GVI) obteve média de NC ( $p=0,001$ ) e mediana de NC ( $p=0,001$ ) inferiores aos resultados do grupo GIV.

**Gráfico 04:** Diferenças entre as médias de percentual de níveis de cinza entre os grupos GIV (três semanas) e GVI (oito semanas) nas regiões de análise maxila e mandíbula.



Fonte: Autora (2013).

**Tabela 04:** Comparação entre os grupos GV e GVI quando as avaliações de níveis de cinza para maxila e mandíbula.

Região	Dado Analisado	Média (Desvio Padrão)	<i>p</i>
GIV X GVI			
	Média de NC	178 (8) X 179 (9,9)	0,898
<b>Maxila</b>	Valor Máximo NC	201 (9,8) X 202 (6,2)	0,776
	Valor Mínimo NC	129 (7,7) X 128 (10,4)	0,755
	Mediana	182 (8,8) X 181 (10)	0,89
	Média de NC	188 (2,6) X 178 (5,7)	0,001*
<b>Mandíbula</b>	Valor Máximo NC	214(4,5) X 210 (5,1)	0,136
	Valor Mínimo NC	118 (12,8) X 107 (7,7)	0,076
	Mediana	192 (2,7) X 182,2(4,8)	0,001*

Nível de significância de 5% (\*)

Tendência a significância (<)

Fonte: Elaborado pela autora (2013).



### 5.3.2 RESULTADO DO ESTUDO HISTOLÓGICO: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS GIV E GVI

#### 5.3.2.1 Análise Maxilar

Quanto à análise de escores atribuídos para a maxila, não houve diferenças estatísticas na comparação de associação das variáveis e os grupos GIV e GVI. A presença dos infiltrado inflamatório foi semelhante nos dois grupos. A vascularização mostrou-se levemente mais intensa no grupo GVI, conforme apêndice D. Os eventos que permearam ambos os grupos que receberam a medicação foram semelhantes. Contudo o grupo GVI apresentou exacerbação dos fenômenos, tendo sido observado em um dos espécimes características histológicas compatíveis com osteonecrose.

Diminuição de células de origem reabsortivas foi uma observação comum para os dois grupos (GIV e GVI) adquirindo a estes um padrão de tecido ósseo mais compacto.

#### 5.3.2.2 Análise Mandibular

A análise mandibular demonstrou diferenças mais expressivas entre os grupos do que os resultados da maxila. Processo inflamatório agudo foi observado no grupo GVI de forma mais intensa do que no grupo GIV.

Áreas necróticas foram observadas em dois espécimes do grupo GVI, enquanto que no grupo GIV a condição não foi observada. A reabsorção dentária foi mais presente no grupo GVI em comparação ao grupo GIV. A vascularização foi semelhante entre os grupos.

Na análise descritiva o grupo GIV apresentou resposta inflamatória frente à agressão causada pelo defeito na coroa dentária. No grupo GVI a resposta inflamatória pareceu diminuída, com aparecimento de zonas de necrose, reduzida reabsorção, neoformação óssea em região de furca e áreas de fibrose foram predominantes.

## 6 DISCUSSÃO

A osteonecrose da arcada ósseo-dentária por uso de bisfosfonatos é um efeito adverso ao uso do fármaco e não uma complicação, como muitos autores assim a classificam. Para a Organização Mundial de Saúde (OMS), a reação adversa é descrita como *“uma resposta nociva e não intencional ao uso de medicamento e que ocorre em doses normalmente utilizadas em seres humanos para a profilaxia, diagnóstico ou tratamento de doenças”* (OMS,1972). Admite-se que uma complicação esteja relacionada a novos eventos mórbidos na evolução de uma determinada enfermidade.

Portanto, a osteonecrose dos maxilares por bisfosfonatos deve ser entendida como uma condição distinta da osteomielite dos maxilares que é caracterizada por um processo inflamatório originário de infecções bacterianas ou fúngicas. Processos infecciosos ocasionais na osteonecrose da arcada ósseo-dentária por bisfosfonatos caracterizam-se por complicações advindas da condição clínica causada pelo uso da medicação.

Considerando que a osteonecrose da arcada ósseo-dentária associada aos bisfosfonatos comumente é precedida por um evento desencadeador, nesse estudo foram realizados dois procedimentos invasivos distintos, a extração dentária em maxila e o defeito com broca sobre a coroa dentária em mandíbula. Marx (2005) relatou que o evento prévio mais frequente é a extração dentária (37,8%) seguida pela doença periodontal (28,6%).

A anatomia radicular dentária do rato, tendo o primeiro molar superior composto por cinco raízes divergentes, foi um fator complicador do procedimento de exodontia. Nesta fase experimental ocorreram fraturas de ápices radiculares. A impossibilidade de acesso para remoção e a permanência de fragmentos radiculares esteve presente em todos os grupos, fato este não considerado como um fator de diferenciação entre os mesmos. O defeito gerado sobre a coroa dos primeiros molares inferiores mimetizou alterações pulpare e processos inflamatórios no periápice semelhantes aos originados pela doença cárie.

Para a mandíbula, a área associada à região de furca dentária, exibia frequentemente, processo inflamatório agudo. Todavia, não pôde ser considerada como uma área de interesse devido às fraturas dentárias originárias do defeito causado pela broca nas coroas dentárias, fato que não permitiu a padronização. Definiu-se assim, que a análise dos grupos GIII, GIV, GV e GVI incluiriam a região apical, uma vez que essa zona reflete as alterações pulpare.

Foram utilizados neste estudo, como modelo animal, ratos com 60 dias,

apresentando nesta fase maturidade sexual e musculoesquelética equivalente a de um animal adulto. Segundo Marx (2005), em seu relato de 119 casos em humanos, o tempo em média para o aparecimento de lesões de osteonecrose dos maxilares induzida pelo uso de bisfosfonatos, foi de 9,4 meses para aqueles que faziam tratamento pelo uso de Ácido Zoledrônico. O presente estudo realizou indução por um período de 21 dias nos grupos GI e GIII. Considerando que 16,7 dias para um rato equivalem ao período de 12 meses para humanos estes grupos mimetizaram um tempo de indução de 15 meses. O grupo GVI por consequência teria recebido tratamento por três anos e quatro meses (QUINN, 2005).

Este estudo optou pelo desenvolvimento de um modelo experimental ausente de doenças ou uso de outras medicações, tendo como foco a aplicação isolada do Ácido Zoledrônico em animais saudáveis. A grande maioria dos trabalhos que utilizam o rato como modelo experimental para o desenvolvimento da osteonecrose dos maxilares por bisfosfonato empregam em conjunto ao fármaco de eleição (bisfosfonato), drogas com características imunossupressoras ou realizaram o desenvolvimento prévio de doenças metabólicas (SONIS et al, 2008; BI et al, 2010; HOKUGO et al, 2010; SASAKI et al, 2010; ALI-ERDEM et al, 2011). O presente trabalho analisou, exclusivamente, o efeito da medicação sobre o tecido ósseo alveolar, considerando que o emprego de outras medicações poderia interferir na análise.

A dose estipulada no presente estudo foi de 0,2mg/kg, semanalmente. Em humanos a dose usual administrada é de 4mg por infusão, com intervalos de três a quatro semanas entre cada aplicação. Considerando-se 70 quilos, o peso médio de um paciente, a dose a ser administrada é de 0,06mg/kg. Para o cálculo da dose e seus intervalos nessa pesquisa, os autores levaram em consideração as diferenças entre o metabolismo ósseo das duas espécies. A dose elevada utilizada, quando comparada ao emprego em humanos, justifica-se diante do metabolismo acelerado e da alta taxa de excreção dos bisfosfonatos, características do modelo animal empregado.

A tomografia computadorizada de feixe cônico foi eleita como método de análise de imagem neste estudo, por tratar-se de um método de rápida aquisição, de menor custo e por reproduzir imagens tridimensionais com pouca distorção. As tomografias computadorizadas de feixe cônico realizam a aquisição por meio de captura volumétrica e então, recebem cortes de acordo com o plano e espessura pretendidos. Já na tomografia computadorizada de feixe em leque ou médicas, a aquisição é realizada por seguimentos e depois reconstruída em volume. Para a avaliação desses exames de imagem utilizou-se

análise baseada nos níveis de tons de cinza da imagem.

Optou-se por não utilizar escala Hounsfield, pois consideramos que as regiões digitalizadas de mesma densidade no crânio podem possuir valores diferentes em tons de cinza quando reconstruída por uma tomografia de feixe cônico. Ao contrário do trabalho desenvolvido por Cankaya e colaboradores (2011), que realizou tomografia computadorizada de feixe cônico para análise do tecido ósseo alveolar de ratos submetidos à terapia com Ácido Zoledrônico e apresentou seus dados utilizando a escala desenvolvida por Hounsfield Hounsfield e Ambrose (1973). Considerando que o valor de imagem de um *voxel* de um órgão depende da sua posição na imagem de volume, ele apresenta valores diferentes de Unidade Hounsfield (HU) para estruturas semelhantes dos tecidos ósseo e mole em diferentes áreas do volume digitalizado (SWENNEN; SCHUTYSER, 2006).

Para o estudo histológico utilizou-se inicialmente, para os grupos GI e GII análise histomorfométrica para avaliação da densidade óssea presente na região de ápice radicular tanto em maxila quanto em mandíbula. Optou-se por não realizar análise de processo inflamatório visto que, estes grupos não apresentaram procedimento cirúrgico associado. A região do ápice radicular foi selecionada por apresentar isolamento de fatores externos associados à cavidade bucal.

O presente trabalho observou alteração no padrão de tecido ósseo alveolar com aumento de níveis de cinza e densidade óssea alveolar associada ao grupo em terapia (GII) quando comparado ao grupo controle (GI). A compactação óssea observada advém principalmente da esperada inativação osteoclástica, causada pelo potente mecanismo de ação da medicação e por sua grande afinidade ao tecido ósseo, aspecto já observado em fêmures na revisão de Russel e colaboradores (2008). Aqui comprovamos que a alteração estende-se também ao complexo maxilo-mandibular. A compactação óssea associada à diminuição de vasos sanguíneos resulta em déficit nutricional das células que compõem o tecido ósseo.

Alterações no remodelamento ósseo alveolar em maxila nos grupos em terapia (GIV e GVI), após exodontia do primeiro molar superior foram observadas neste trabalho. O procedimento cirúrgico foi realizado sobre as estruturas modificadas pela administração do medicamento previamente a extração. Esta condição modificou e atrasou as fases iniciais do reparo ósseo. A compactação óssea e diminuição do aporte sanguíneo prejudicou a migração de células endoteliais, ocasionando supressão da angiogênese, como já relatado por Kobayashi e colaboradores (2010) e Bi e colaboradores (2010). Ausente de suprimento

vascular, a migração de células inflamatórias para o alvéolo torna-se dificultada, bem como a organização do coágulo e substituição por uma rede de fibrina que fornecerá suporte para o processo de reparo. Prejuízos a estas etapas geram lentidão na formação da nova matriz óssea e susceptibilidade a infecções.

A osteonecrose induzida por bisfosfonato foi observada no grupo teste (GVI) com oito semanas de terapia. O aumento da vascularização associado a esta condição é decorrente do intenso processo inflamatório agudo instalado, em concordância com os achados de Bi e colaboradores (2010), os quais relataram condições semelhantes em período de observação mais prolongado.

A avaliação da área alveolar, neste estudo, foi realizada aos 56 dias pós-extração dentária. Período este, estendido quando comparado a outros estudos (SONIS et al, 2008; CONTE NETO et al, 2013). No período de cinco semanas pós-cirúrgicas ulceração epitelial estava ausente. Porém, alterações no reparo ósseo como necrose e presença de infiltrado inflamatório aumentado foram observadas.

A intensa presença de fibras colágenas e diminuição de células reabsortivas, características da modificação e atraso do reparo ósseo alveolar foi uma constante para ambos os grupos teste (GIV e GVI). A ausência de matriz óssea organizada e presença de epitélio hiperplásico invaginado são achados representativos, de acordo com Miloro (2008), de atraso no reparo ósseo alveolar.

Alterações na capacidade reacional dos tecidos de suporte dentário foram observadas após defeito com broca sobre a coroa dentária nos primeiros molares inferiores, em mandíbula. Acredita-se que a continuada deposição de tecido mineralizado, ausente de remodelação osteoclástica e diminuição do aporte sanguíneo conferiu ao grupo teste de três semanas (GIV) níveis de cinza mais elevados em comparação ao grupo controle (GIII).

A manutenção da terapia por oito semanas (GVI) provocou um quadro bastante distinto, onde os níveis de cinza apresentaram-se diminuídos. Houve formação de zonas de necrose, acompanhadas por processo inflamatório agudo. O aumento de citocinas advindas do processo inflamatório possivelmente contribuiu para a manutenção do quadro. O processo reacional dos tecidos de suporte dentário, na região onde foi realizado o defeito oclusal com broca, permaneceu retardado no grupo que fez o uso da medicação (GVI) comparado ao grupo controle (GIII).

Neste estudo, as cristas alveolares dos molares inferiores dos grupos teste (GIV e GVI) também apresentaram pouca remodelação em comparação com os grupos controle

(GIII e GV). O processo de reabsorção óssea em mandíbula nestes grupos alterou não somente a função osteoclástica, mas também sugeriu alteração na deposição óssea. Tais observações já descritas em estudos *in vitro* revelam alterações celulares provocadas por bisfosfonatos em outras estruturas que não osteoclastos (ROELOFS; THOMPSON; GORDON; ROGERS, 2006). Sugere-se que há alterações nos mecanismos de síntese osteoblástica causada pelo medicamento, tal fato deve ser mais profundamente investigado. Diante deste fato, e nas condições metodológicas aplicadas neste estudo, o seguimento da terapia por uso de bisfosfonato frente a um procedimento invasivo odontológico, foi considerado um agravante para o desenvolvimento do quadro de osteonecrose.

## 7 CONCLUSÃO

O Ácido Zoledrônico, isoladamente, retardou o reparo ósseo alveolar após extração dentária no grupo que realizou terapia continuada por oito semanas (GVI) em comparação ao grupo controle (GV), com diminuição dos níveis de cinza e alterações histológicas.

A manutenção da terapia com uso de bisfosfonato nitrogenado, após procedimento de exodontia, acentuou e agravou a capacidade de reparo ósseo alveolar.

A terapia com Ácido Zoledrônico pareceu alterar a densidade do tecido ósseo alveolar na ausência de procedimento invasivo.

O Ácido Zoledrônico diminuiu a capacidade reacional dos tecidos de suporte dentário, apresentando níveis de cinza mais elevado no grupo teste (GIV) comparado ao grupo controle (GV).

O modelo experimental proposto neste estudo foi capaz de desenvolver alterações no tecido ósseo alveolar de ratos por meio de terapia por Ácido Zoledrônico.

## **8 FINANCIAMENTO**

O presente estudo foi financiado junto ao Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).



## REFERÊNCIAS

ALMĂSAN, H.A. et al. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates. Discussion over 52 cases. **Rom. J. Morphol. Embryol.**, Craiova, v.52, n.4,p.1233-1241, 2011.

BI, Y. et al. Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. **Am. J. of Pathology**, Philadelphia, v.177, n. 1, p.280-290, mayo 2010. doi:10.2353/ajpath.2010.090592

BERGOLI, R.D.; et al. Isotretinoin effect on alveolar repair after exodontia--a study in rats. **Oral Maxillofac Surg.**, Berlin,v.15,n.2, p.85-92, 2011. doi: 10.1007/s10006-010-0235-8.

BLACK, D.M. et al. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.356, n.18,p.1809-1822, Mayo 2007.

BRASIL, Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso vii do par. 1º do art. 225 da constituição federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.

CANKAYA, A.B. et al. Use of cone-beam computerized tomography for evaluation of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in an experimental rat model. **Int J Med Sci.**, Australia, v.8, n.8,p.667-72, Out. 2011.

CARVALHO, A. C. P.; OKAMOTO, T. Reparação do Alvéolo Dental. In: \_\_\_\_\_ **Cirurgia Bucal: Fundamentos Experimentais Aplicados à Clínica**. São Paulo: Panamericana, 1987. Cap. 5, p. 55-80

CELLA, L; et al. Autologous bone marrow stem cell intralesional transplantation repairing bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw. **Head & Face Medicine**, London, v.17, p. 7-16, Ago. 2011. doi: 10.1186/1746-160X-7-16.

COXON, J.P.; OADES, G.M.; KIRBY, R.S.; COLSTON, K.W. Zoledronic acid induces apoptosis and inhibits adhesion to mineralized matrix in prostate cancer cells via inhibition of protein prenylation. **BJU Int.**, Oxford, v.94, n.1, p.164-170, Jul. 2004.

CROUCHER, P.I. et al. Zoledronic acid treatment of 5T2MM-bearing mice inhibits the development of myeloma bone disease: evidence for decreased osteolysis, tumor burden and angiogenesis, and increased survival. **J.Bone Miner. Res.**, New York, v.18, n.3, p.482-492, Mar. 2003.

CURI, M.M. et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws-an initial case series report of treatment combining partial bone resection and autologous platelet-rich plasma. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia,v.69, n.9, p.2465-2472, Set. 2011. doi:10.1016/j.joms.2011.02.078.

CONTE NETO, N. et al. Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rodents. **Int J Exp Pathol.**, Oxford, v.94, n.1, p.65-73, Fev.2013 doi: 10.1111/iep.12007.

GUGLIELMOTTI, M. B.; CABRINI R. L. Alveolar Wound Healing and Ridge Remodeling After Tooth Extraction in the Rat: A Histologic, Radiographic, and Histometric Study. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v.43, n.5, p.359-364, Mayo. 1985.

HARKNESS, J.; WAGNER, J. **Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores.** 3.ed., Editora Roca, 1993, 238p.

HOKUGO, A. et al. Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecroses of the jaw with vitamin D deficiency in rats. **J. of Bone Miner. Res.**, New York vol. 25, p.1337-1349, jun. 2010. doi: 10.1002/jbmr.23

JUNQUEIRA, L.C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto/atlas.** 11. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p

KOBAYASHI, Y. et al. Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice. **J. Bone Miner. Metab.**, Tokyo, v. 28, n.2, p.165-175, Mar. 2010. doi:10.1007/s00774-009-0128-9

KOS, M.; BRUSCO, D.; KUEBLER, J.; ENGELKE, W. Clinical comparison of patients with osteonecrosis of the jaws, with and without a history of bisphosphonates administration. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v.39, n.11, p.1097-102, Nov. 2010. doi:10.1016/j.ijom.2010.04.054.

LIN, J.H. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. **Bone**, Chengdu, v.18, n.2, p.75-85, Feb.1996.

MARX, R.E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v.61, n.9, p.1115-1117, Set. 2003.

MARX, R.E. et al. Bisphosphonate - Induced Exposed Bone (Osteonecrosis / Osteopetrosis) of the Jaws: Risk Factors, Recognition, Prevention, and Treatment. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 63, n. 11, p. 1567-1575, Nov. 2005.

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.**, Philadelphia, v.65, n.12, p.397-410, Dec. 2007.

METCALF, S.; PANDHA, H.S.; MORGAN, R. Antiangiogenic effects of zoledronate on cancer neovasculature. **Future Oncol.**, London, v.1, n.11, p.1325-33, Nov. 2011. doi:10.2217/fon.11.113.

MILORO, M. Princípios da cirurgia bucomaxilofal de Peterson. 2 ed. São Paulo: Liv. Santos, 2008. 2v.

MOZZO, P. et al. A new volumetric CT machine for dental imaging based on the cone-beam technique: preliminary results. **Eur Radiol.**, Berlin, v. 8, n. 9, p. 1558-1564, 1998.

NAIK, N.H.; RUSSO, T.A.; Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: the role of actinomyces. **Clin. Infect. Dis.**, v.49, n.1, p.1729-32, Dec. 2009. doi: 10.1086/648075.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD - OMS. **International drug monitoring: the role of national centers**. Ginebra: OMS, 1972

PHAM, A. N. et al. Cost-Effectiveness of Oral Bisphosphonates for Osteoporosis at Different Ages and Levels of Life Expectancy. **J. Am. Geriatr. Soc.**, New York, v.59, n.9, p.1642-1649, Set. 2011. doi:10.1111/j.1532-5415.2011.03571.x.

RODAN, G.A. Mechanisms of action of bisphosphonates. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, Palo Alto, v.38, p.375-88, 1998.

ROELOFS, A.J.; THOMPSON, K.; GORDON, S.; ROGERS, M.J. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. **Clin. Cancer Res.**, Denville, v.15, n.20, p.6222s-6230s, Out. 2006.

RUGGIERO, S.L. et al. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 62, n. 5, p. 527-534, Mayo 2004.

RUGGIERO, S.L. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): initial discovery and subsequent development. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v.67, n.1, p.13-18, Mayo 2009. doi: 10.1016/j.joms.2008.10.005.

RUSSELL, R.G.; WATTS, N.B.; EBETINO, F.H.; ROGERS, M.J. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. **Osteoporos. Int.**, London, v.19, n.6, p.733-59, jun.2008. doi:10.1007/s00198-007-0540-8.

SAVORY, W.S. A Case of Necrosis of the Jaw, and other Bones, from the Fumes of Phosphorus. **Med Chir Trans.**, London, v.57, p.187-91, 1874.

SEDGHIZADEH, P.P. et al. Identification of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v.66, n.4, p.767-75, Abr. 2008. doi:10.1016/j.joms.2007.11.035.

SIRIS, E. S. et al. Estimating Bisphosphonate Use and Fracture Reduction Among US Women Aged 45 Years and Older, 2001-2008. **J. Bone Miner. Res.**, New York, v. 26, n.1, p.3-11, Jan. 2011. doi: 10.1002/jbmr.189.

SONIS, S.T.; et al. Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. **Oral Oncol.**, Oxford, v.45, n. 2, p. 164-172, Fev. 2008. doi:10.1016/j.oraloncology.2008.04.013.

SWENNEN, G.R.; SCHUTYSER, F. Three-dimensional cephalometry: spiral multi-slice vs cone-beam computed tomography. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, St. Louis, v.130, n.3, p. 410-6, Sep. 2006.

QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? **Nutrition**, Los Angeles, v.21, n.6, p.775-7, Jun. 2005.

TEN CATE, A. R. Osso. In:\_\_\_\_\_. **Histologia Bucal: Desenvolvimento, Estrutura e Função**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. Cap. 7, p. 101-122.

## ANEXOS

**Anexo A: Termo de aprovação de projeto pela Comissão de Ética no uso de animais.**

**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

**Projeto:** 120108

**Data da Versão do Projeto:** 31/05/2012

**Pesquisadores:**

DEISE PONZONI

EDELA PUR-CELLI

VIVIANE NEVES PACHECO

RAFAEL SILVEIRA BRAGA

ALESSANDRA JUNGES

CARLOS EDUARDO E BARALDI

ANGELO LUIZ FREDDO

JULÉS RENAN DUI RA BEMFICA

**Título:** Terapia por difosfonato nitrogenado: avaliação em ratos da estrutura alveolar após exodontia

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Dr. Alessandro Osvaldt  
Coordenador CEUA/HCPA

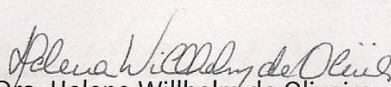
Porto Alegre, 24 de maio de 2012.

**Anexo B: Autorização para o uso das dependências da clínica *Facim3D*****DECLARAÇÃO**

Declaro para os devidos fins que a Faciem 3D Diagnóstico por Imagem LTDA se responsabiliza em seguir rigorosamente o protocolo da metodologia proposta no projeto de pesquisa intitulado *TERAPIA POR BISFOSFONATO NITROGENADO: AVALIAÇÃO EM RATOS DA ESTRUTURA ALVEOLAR*. – desenvolvido pela pesquisadora C.D. Viviane Neves Pacheco com orientação da Profa. Dra. Deise Ponzoni e que é parte dos requisitos para o Curso de Mestrado em Clínica Odontológica / Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-faciais do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFRGS.

A Faciem 3D Diagnóstico por Imagem LTDA autoriza que sejam realizados os exames para tanto solicitados pelo pesquisador, se comprometendo a resguardar a confidencialidade, o sigilo, a privacidade, a proteção das imagens, garantindo a utilização e/ou veiculação apenas aos envolvidos diretamente na pesquisa.

O orçamento dos serviços a serem prestados para fins da referida pesquisa é de R\$ 1.680,00 (Mil seiscientos e oitenta reais).

  
Prof. Dra. Helena Willhelm de Oliveira

Sócia Gerente da Faciem 3D Diagnóstico por Imagem LTDA

## APÊNDICES

Apêndice A: Tabela com dados da análise tomográfica e níveis de cinza da maxila.

Grupos	Animal	Área (ROI)	Média em Níveis de Cinza	Desvio Padrão	Valor Mínimo (Níveis de Cinza)	Valor Máximo (Níveis de Cinza)	Mediana	
G1	1	3,7	170,95	13,17	136	198	169	
	2	3,7	185,60	13,20	139	210	188	
	3	3,7	183,82	16,60	125	210	185	
	4	3,7	173,85	10,35	149	197	174	
	5	3,7	186,75	15,10	128	210	188	
	6	3,7	171,07	10,01	138	193	172	
	7	3,7	181,15	12,27	127	202	182	
	<b>Média</b>		<b>179,03</b>	<b>12,96</b>	<b>134,57</b>	<b>202,86</b>	<b>179,71</b>	
G2	8	3,7	184,31	15,34	122	207	187	
	9	3,7	171,62	12,03	131	193	173	
	10	3,7	166,42	11,98	138	197	165	
	11	3,7	170,87	16,22	117	197	175	
	12	3,7	194,68	11,56	154	214	196	
	13	3,7	186,12	13,86	157	213	186	
	14	3,7	175,09	20,26	109	204	184	
	<b>Média</b>		<b>178,44</b>	<b>14,46</b>	<b>132,57</b>	<b>203,57</b>	<b>180,86</b>	
G3	15	3,9	189,16	14,92	132	208	193	áreas diferentes em função das raízes residuais
	16	3,9	188,90	10,75	151	207	190	
	17	3,9	184,06	14,59	114	207	188	
	18	3,8	185,18	19,46	121	210	192	
	19	4,0	172,82	17,81	117	197	177	
	20	3,9	176,03	20,71	116	206	181	
	<b>Média</b>		<b>182,69</b>	<b>16,37</b>	<b>125,17</b>	<b>205,83</b>	<b>186,83</b>	
G4	21	Animal excluído						
	22	3,7	175,47	13,62	128	200	176	áreas diferentes em função das raízes residuais
	23	3,7	183,14	15,63	130	212	184	
	24	3,6	191,11	17,80	132	215	198	
	25	3,6	172,69	18,79	115	196	180	
	26	3,7	185,16	9,80	134	202	187	
	27	3,6	170,42	15,98	126	190	175	
	28	3,6	171,33	9,25	140	190	172	
	<b>Média</b>		<b>178,47</b>	<b>14,41</b>	<b>129,29</b>	<b>200,71</b>	<b>181,71</b>	
G5	29	3,7	189,03	11,68	145	208	192	áreas diferentes em função das raízes residuais
	30	3,7	187,20	14,12	135	205	192	
	31	3,7	190,08	11,77	148	208	192	
	32	3,8	183,29	18,36	131	209	188	
	33	3,7	188,76	12,72	134	192	169	
	34	3,6	194,21	12,04	147	220	197	
	35	3,8	182,4	11,21	143	199	185	
	<b>Média</b>		<b>187,85</b>	<b>13,13</b>	<b>140,43</b>	<b>205,86</b>	<b>187,86</b>	
G6	36	3,7	176,57	15,69	118	203	178	áreas diferentes em função das raízes residuais
	37	3,8	179,45	14,09	145	204	179	
	38	3,6	186,45	16,77	116	206	190	
	39	3,6	185,84	11,95	135	204	186	
	40	3,8	177,99	14,21	126	195	183	
	41	3,6	158,99	16,61	121	192	161	
	42	3,7	188,48	13,66	133	210	190	
	<b>Média</b>		<b>179,11</b>	<b>14,71</b>	<b>127,71</b>	<b>202,00</b>	<b>181,00</b>	

Fonte: Autora (2013).

**Apêndice B: Tabela com dados da análise tomográfica e níveis de cinza da mandíbula.**

Grupos	Animal	Área em mm <sup>2</sup> (ROI)	Média em Níveis de Cinza	Desvio Padrão	Valor Mínimo (Níveis de Cinza)	Valor Máximo (Níveis de Cinza)	Mediana
<b>G1</b>	1	8,07	177,26	20,08	96	206	182
	2	8,07	180,59	20,96	103	211	187
	3	8,07	181,54	20,68	108	213	185
	4	8,07	165,73	30,58	59	202	174
	5	8,07	182,68	17,85	111	210	187
	6	8,07	170,62	22,74	82	203	178
	7	8,07	178,16	18,61	102	202	183
	<b>Média</b>		<b>176,65</b>	<b>21,64</b>	<b>94,43</b>	<b>206,71</b>	<b>182,29</b>
<b>G2</b>	8	8,07	171,38	24,73	94	207	177
	9	8,07	178,42	26,87	91	215	185
	10	8,07	166,94	27,27	84	203	176
	11	8,07	188,14	18,19	108	212	192
	12	8,07	189,89	15,75	119	215	192
	13	8,07	190,38	14,28	128	213	193
	14	8,07	182,05	18,73	109	207	187
	<b>Média</b>		<b>181,03</b>	<b>20,83</b>	<b>104,71</b>	<b>210,29</b>	<b>186,00</b>
<b>G3</b>	15	8,07	187,68	19,16	100	208	193
	16	8,07	185,56	17,35	108	213	190
	17	8,07	177,47	18,60	105	207	184
	18	8,07	182,06	18,61	100	203	188
	19	8,07	170,94	23,66	96	206	177
	20	8,07	184,78	26,45	88	213	193
	<b>Média</b>		<b>181,42</b>	<b>20,64</b>	<b>99,50</b>	<b>208,33</b>	<b>187,50</b>
<b>G4</b>	21	Animal excluído					
	22	8,07	187,87	20,81	105	215	193
	23	8,07	186,43	16,20	120	215	189
	24	8,07	184,57	25,52	103	213	193
	25	8,07	188,43	16,71	110	211	193
	26	8,07	186,39	15,98	129	223	188
	27	8,07	192,27	14,57	120	212	196
	28	8,07	190,65	12,4	138	209	193
		<b>Média</b>		<b>188,09</b>	<b>17,46</b>	<b>117,86</b>	<b>214,00</b>
<b>G5</b>	29	8,07	186,61	19,27	131	214	191
	30	8,07	180,35	21,42	104	210	186
	31	8,07	182,30	21,00	107	213	187
	32	8,07	166,43	27,29	103	215	170
	33	8,07	191,34	15,18	131	213	196
	34	8,07	179,19	18,30	114	210	182
	35	8,07	179,27	22,47	115	208	188
	<b>Média</b>		<b>180,78</b>	<b>20,70</b>	<b>115,00</b>	<b>211,86</b>	<b>185,71</b>
<b>G6</b>	36	8,07	181,29	16,38	104	205	185
	37	8,07	178,70	20,84	114	218	181
	38	8,07	183,16	21,73	96	212	190
	39	8,07	167,40	28,13	102	207	177
	40	8,07	175,57	16,72	118	207	177
	41	8,07	175,89	17,19	103	205	180
	42	8,07	184,01	18,63	111	215	186
	<b>Média</b>		<b>178,00</b>	<b>19,95</b>	<b>106,86</b>	<b>209,86</b>	<b>182,29</b>

Fonte: Autora (2013).



**Apêndice C: Tabela com dados referentes à análise histomorfométrica dos grupos GI e GII**

<b>Região</b>	<b>Grupo</b>	<b>Id</b>	<b>Percentual de Tecido Ósseo</b>
<b>Maxila</b>	GI	1	81,5
	GI	2	93,9
	GI	3	91,9
	GI	4	90,0
	GI	5	96,5
	GI	6	86,7
	GI	7	90,7
	GII	8	95,0
	GII	9	91,6
	GII	10	97,7
	GII	11	95,6
	GII	12	90,4
	GII	13	90,9
	GII	14	95,9
<b>Mandíbula</b>	GI	1	93,1
	GI	2	86,0
	GI	3	78,8
	GI	4	93,7
	GI	5	96,4
	GI	6	84,8
	GI	7	86,6
	GII	8	87,1
	GII	9	96,8
	GII	10	94,4
	GII	11	91,3
	GII	12	DP
	GII	13	DP
	GII	14	95,8

DP: Dado Perdido;  
 Fonte: Autora (2013).

Apêndice D: Tabela com dados referentes à análise histológica da maxila

Grupo	ID	Infiltrado Inflamatório	Tipo de Infiltrado Inflamatório	Vascularização	Necrose Óssea	Neoformação Óssea	Reabsorção Dentária.
GIII	15	0	98	1	0	1	1
GIII	16	1	1	2	0	1	1
GIII	17	0	98	2	0	1	1
GIII	18	0	98	2	0	1	1
GIII	19	0	98	2	0	1	1
GIII	20	0	98	2	0	1	1
GIII	21	99	99	99	99	99	99
GIV	22	0	98	2	0	1	1
GIV	23	0	98	2	0	1	1
GIV	24	2	1	1	0	1	1
GIV	25	0	98	2	0	1	1
GIV	26	0	98	2	0	1	1
GIV	27	0	98	2	0	1	1
GIV	28	0	98	1	0	1	1
GV	29	0	98	1	0	1	0
GV	30	0	98	1	0	1	1
GV	31	0	98	2	0	1	1
GV	32	0	98	1	0	1	1
GV	33	1	1	1	0	1	1
GV	34	0	98	2	0	1	1
GV	35	0	98	2	0	1	98
GVI	36	0	98	2	0	1	1
GVI	37	0	98	2	0	1	1
GVI	38	0	98	2	0	1	1
GVI	39	0	98	2	0	1	1
GVI	40	0	98	2	0	1	1
GVI	41	3	0	3	1	1	1
GVI	42	0	98	1	0	1	1

Dado não aplicável (98)

Dado perdido (99).

Fonte: Autora (2013).

Apêndice C: Tabela com dados referentes à análise histológica da mandíbula.

Grupo	ID	Infiltrado Inflamatório	Tipo de Infiltrado Inflamatório	Vascularização	Necrose Óssea	Reabsorção Dentária.
GIII	15	0	98	3	0	0
GIII	16	0	98	2	0	0
GIII	17	2	0	3	0	0
GIII	18	1	1	2	0	0
GIII	19	99	99	99	99	99
GIII	20	0	98	2	0	1
GIII	21	99	99	99	99	99
GIV	22	0	98	2	0	0
GIV	23	1	1	1	0	0
GIV	24	0	98	2	0	0
GIV	25	0	98	2	0	0
GIV	26	0	98	2	0	0
GIV	27	0	98	2	0	0
GIV	28	0	98	2	0	1
GV	29	0	98	1	0	0
GV	30	99	99	99	99	99
GV	31	1	1	2	0	1
GV	32	0	98	2	0	0
GV	33	99	99	99	99	99
GV	34	0	98	2	0	0
GV	35	99	99	99	99	99
GVI	36	0	98	2	0	1
GVI	37	3	0	2	1	0
GVI	38	99	99	99	99	99
GVI	39	99	99	99	99	99
GVI	40	3	0	2	0	1
GVI	41	3	0	2	1	1
GVI	42	0	98	2	0	1

Dado não aplicável (98)

Dado perdido (99).

Fonte: Autora (2013).