

**UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO**

**CAMILA INÊS MARTINS FERREIRA**

**MODIFICAÇÕES HISTOLÓGICAS NO REPARO  
PERIODONTAL DE RATOS TRATADOS COM  
BISFOSFONATO ASSOCIADO AO LASER DE  
BAIXA INTENSIDADE**

BAURU  
2013

**CAMILA INÊS MARTINS FERREIRA**

**MODIFICAÇÕES HISTOLÓGICAS NO REPARO  
PERIODONTAL DE RATOS TRATADOS COM  
BISFOSFONATO ASSOCIADO AO LASER DE  
BAIXA INTENSIDADE**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado ao Centro de Ciências  
da Saúde como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Cirurgião  
Dentista, sob orientação Profa. Dra.  
Patrícia Pinto Saraiva.

BAURU  
2013

Ferreira, Camila Inês Martins

F3831m

Modificações histológicas no reparo periodontal de ratos tratados com bisfosfonato associado ao laser de baixa intensidade / Camila Inês Martins Ferreira -- 2013.

31f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pinto Saraiva.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Histológico. 2. Bisfosfonato. 3. Periodontal. 4. Laser. I. Saraiva, Patricia Pinto. II. Título.

**CAMILA INÊS MARTINS FERREIRA**

**MODIFICAÇÕES HISTOLÓGICAS NO REPARO PERIODONTAL DE  
RATOS TRATADOS COM BISFOSFONATO ASSOCIADO AO LASER  
DE BAIXA INTENSIDADE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de Cirurgião Dentista, sob orientação Profa. Dra. Patrícia Pinto Saraiva.

Banca examinadora:

---

Profa. Dra. Mariza Matsumoto  
Universidade Sagrado Coração

---

Prof. Dr. Luis Augusto Esper  
Universidade Sagrado Coração

Bauru, 10 de dezembro de 2013

*Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio e Silvia, todo meu esforço e dedicação não seriam suficientes, se não fosse o apoio incansável e incalculável de vocês durante todos esses anos. Agradeço pelo exemplo de determinação, e acima de tudo pelo incentivo constante para a concretização deste sonho.*

*A minha irmã Natália, agradeço pelo grande incentivo e apoio para superar meus desafios durante esta jornada, sua amizade é muito importante para mim.*

*Ao meu namorado Gustavo, pelo constante apoio, dedicação, compreensão, pelo exemplo de profissional e pelo incansável incentivo, alias, seu companheirismo foi essencial para a minha caminhada, você foi meu porto seguro. Obrigada por ser antes de tudo, meu amigo.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço as Profa. Dra. Patrícia Pinto Saraiva e Profa. Dra. Mariza Matsumoto, inicialmente pela confiança, incentivo, compreensão, serenidade, amizade e principalmente, pelo exemplo da docência. O amor de vocês pela pesquisa que é contagiante, obrigada pela oportunidade de ter sido orientada por vocês durante este período.

Agradeço a todas as pessoas que indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e a Claudia Bighetti pela orientação, paciência, amizade e minha grande admiração.

*“Aqueles que estão apaixonados pela prática sem a ciência são iguais ao piloto que navega sem leme ou bússola e nunca tem certeza para onde vai. A prática deve estar sempre baseada em um perfeito conhecimento da teoria”*  
(Leonardo da Vinci)

## RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar as características histológicas e morfométricas do reparo periodontal em ratos tratados com ácido zolendrônico e aplicação de laser de baixa intensidade (LTB). Ratos machos foram divididos em três grupos, com 5 animais cada: (G1) controle com doença periodontal; (G2) zoledronato com doença periodontal; (G3) zoledronato, doença periodontal e LTB. Os grupos 2 e 3 foram tratados com zoledronato (Blaztere®) por via endovenosa, com um total de 5 aplicações, realizadas de 15 em 15 dias, até o momento da eutanásia. Todos os ratos foram submetidos ao procedimento de ligadura para indução da doença periodontal e após o período de 7 dias todos foram submetidos ao procedimento de raspagem e alisamento radicular, e somente o G3 foi submetido à LTB (AlGaAs-808 nm, CW, 30 mW, de 0,028 cm<sup>2</sup> área do feixe de laser média), por 15s de tempo de irradiação (16 J/cm<sup>2</sup> por ponto-total de 64 J/cm<sup>2</sup> por sessão). Após 7, 14 e 28 dias a eutanásia foi realizada para posterior análise histomorfométrica, nas regiões de crista óssea e furca do periodonto. A análise estatística foi realizada por meio do teste de análise de variância (ANOVA) seguido do Teste de Tukey. O resultado da análise da crista óssea mostrou que no período de 7 dias foi encontrada maior perda óssea quando o zoledronato foi utilizado isoladamente. Na análise da região de furca, no período de 7 dias também foi encontrada maior perda nos grupos que receberam somente zoledronato. Porém, aos 28 dias, notou-se uma diminuição na perda óssea quando o zoledronato foi aplicado. Em conclusão, o zoledronato alterou o padrão de reparo periodontal, produzindo maior perda de tecido ósseo nos períodos iniciais, mas reverteu o processo nos períodos mais longos de análise. Ainda que a aplicação do laser associado ao zoledronato não apresente melhora no reparo tecidual, pode-se notar uma menor perda óssea, sendo não significativa.

**Palavras-chave:** Histológico. Bisfosfonato. Periodontal. Laser.

## ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate the histological and immunohistochemical pattern in periodontal repair in rats submitted to zoledronic acid therapy and application of low level laser therapy (LLLT). Male rats were divided into three groups with five animals each: (G1) control with periodontal disease; (G2) zoledronate with periodontal disease; (G3) zoledronate, periodontal disease and LLLT. Groups 2 and 3 were treated with zoledronate (Blaztere ®) intravenously, with a total of 5 applications, held from 15 to 15 days, until the time of euthanasia. All rats underwent ligation procedure for induction of periodontal disease and after 7 days all were subjected to scaling and root planing procedure, and only the G3 underwent LLLT (AlGaAs-808 nm, CW, 30 mW, 0.028 cm<sup>2</sup> area of the laser beam average), 15 s irradiation time (16 J/cm<sup>2</sup> by point-total of 64 J/cm<sup>2</sup> per session). After 7, 14 and 28 days histomorphometric analyzes are performed in regions of periodontal to check the bone and immunohistochemical analyzes in areas of crestal bone and periodontal furcation. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test. For all analyzes, p values <0.05 are considered statistically significant. The result of the analysis showed that the bone crest at 7 days increased bone loss was found when the zoledronate was used alone. In the analysis of the furcation area in the period of 7 days greatest loss was also found in the groups receiving only zoledronate. However, after 28 days, we noticed a decrease in bone loss when zoledronate was applied. In conclusion, the zoledronate changed the pattern of periodontal healing, producing greater loss of bone tissue in the initial periods, but reversed the process for longer periods of analysis. Although laser application associated with zoledronate does not improve tissue repair, it can be noted a minor bone loss, not being significant.

Keywords: Histological. Bisphosphonates. Periodontal. Laser.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	14
2.1 OBJETIVO GERAL .....	14
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO .....	14
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	15
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	15
3.2 LIGADURA DENTAL .....	16
3.3 LASERTERAPIA .....	17
3.4 EUTANÁSIA ANIMAL E PREPARAÇÃO DO TECIDO .....	17
3.5 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA .....	17
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	18
<b>4 RESULTADOS</b> .....	19
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	22
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	26
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	27

## 1 INTRODUÇÃO

A efetiva ação antirreabsortiva dos bisfosfonatos sobre o tecido ósseo tem contribuído para a ampla indicação destes medicamentos no tratamento de diversas doenças ósseas, tais como a osteoporose, doença de Paget e mieloma múltiplo, bem como metástases ósseas associadas a neoplasias malignas de mama e de próstata. (RUGGIERO et al., 2004; MARX et al., 2005; COXON et al., 2006). Entretanto, apesar dos comprovados benefícios desses fármacos no tratamento de tais doenças, estudos recentes alertam a comunidade científica e odontológica acerca de um grave efeito colateral, denominado osteonecrose dos maxilares relacionada ao uso de bifosfonatos, ou BRONJ, do inglês *Biphosphonate Related Osteonecrosis of the Jaw*.

A BRONJ caracteriza-se pela exposição óssea dos maxilares por um período maior que oito semanas em pacientes que façam ou tenham feito uso de bisfosfonatos e que não tenham recebido tratamento radioterápico na região de cabeça e pescoço (RUGGIERO et al., 2009). A lesão pode ser assintomática no início e até extremamente dolorosa em estágios mais avançados, podendo estar acompanhada de sinais clínicos como ulceração, edema, supuração e presença de fistula intra ou extrabucal devido à infecção secundária (MARX et al., 2005; OTTO et al., 2011). Nos exames por imagem visualiza-se, por vezes, uma lesão osteolítica, não raro envolvendo fratura patológica de mandíbula (MARX et al., 2005; MARX et al., 2009).

Embora também tenham sido relatados casos de BRONJ induzida pelo uso prolongado de bifosfonatos menos potentes, administrados por via oral (RUGGIERO et al., 2004; MARX et al., 2005; BAMIAS et al., 2005; BAGAN et al.; 2006; DIMITRAKOPOULOS & MAGAPOULOS, 2006; MARX & ULLOA, 2007; OTTO et al., 2011), a maior parte das ocorrências de BRONJ deve-se ao uso de bifosfonatos altamente potentes, o Pamidronato e o Zoledronato, ambos administrados por via endovenosa para o tratamento de doenças malignas. Estudos epidemiológicos apontam para uma incidência de BRONJ entre 0,8 e 12% induzida por Pamidronato

e Zoledronato (BAMIAS et al., 2005; DIMIPOULOS et al.; 2009) contra 0,1% induzidas por bifosfonatos de uso oral (LO et al., 2010).

A fisiopatologia da BRONJ não está totalmente esclarecida, mas acredita-se que a capacidade dos bifosfonatos de suprimir a remodelação óssea, por meio da indução dos osteoclastos a apoptose (COXON et al., 2006; GOYTIA et al.; 2009), torne o osso dos maxilares acelular e avascular. Além disso, citam-se também outros mecanismos de supressão da remodelação, como a inibição do recrutamento e diferenciação de células precursoras de osteoclastos, bem como a inibição da angiogênese (SARATHY et al., 2005; COXON et al., 2006). Outro importante efeito dos bifosfonatos associado à fisiopatologia da BRONJ é a toxicidade dessa substância ao tecido mole, levando queratinócitos da mucosa oral a apoptose (REZSKA et al., 2001; LANDESBURG et al., 2008), o que facilita a exposição do osso subjacente danificado ao meio bucal.

O principal agente desencadeador relatado da BRONJ é a extração dentária (MARX et al., 2005; DIMOPOULUS et al., 2009), principalmente naquelas cuja indicação está diretamente relacionada com o comprometimento dos tecidos periodontais (RUGGIERO et al., 2004, FICARRA & BENINATI, 2007; MARX et al., 2007). Ficarra & Beninati (2007) diagnosticaram BRONJ em 9 pacientes que passaram por exodontias devido à doença periodontal (DP). De todos os casos de BRONJ relatados por Marx et al., (2005), que foram desenvolvidos após exodontias, 84% das extrações eram por indicação periodontal. Além disso, a presença da DP, já é considerada por si só um fator de risco para BRONJ, em virtude da presença do biofilme bacteriano (MARX et al., 2007; RUGGIERO et al., 2009).

A doença periodontal tem altas taxas de prevalência na população mundial adulta, sendo a segunda principal doença dentária (PETERSEN & OGAWA, 2005; ALBANDAR et al., 1999). Sua patogênese inicia-se com formação do biofilme microbiano supragengival (DARVEAU et al., 1997; ZIJNGE et al., 2010; GREENSTEIN, 2000), colonizado por bactérias gram-positivas aeróbias (ZIJNGE et al., 2010), que ativam a resposta inflamatória da gengiva em torno do dente, conhecida como gengivite (KINANE, 2001). Com a maturação do biofilme ocorrerá a transição de bactérias gram-positivas aeróbias para gram-negativas anaeróbias

(DARVEAU et al., 1997; KINANE, 2001; GREENSTEIN, 2000; ZIJNGE et al., 2010), levando à progressão da doença para periodontite, em pacientes suscetíveis. A periodontite envolve a perda de tecido ósseo e tecidos conjuntivos e epiteliais (KINANE, 2001).

A presença de bactérias provenientes da DP colonizando o tecido ósseo avascular é um achado comum entre portadores de BRONJ. SEDGHIZADEH et al. (2008) analisaram o osso necrótico removido de quatro pacientes com BRONJ e de 10 pacientes (SEDGHIZADEH et al., 2009). Em todos os pacientes foram possíveis constatar grandes áreas de biofilme onde foram identificadas bactérias gram-positivas e gram-negativas, bem como aeróbios e anaeróbios que são encontrados especificamente na doença periodontal. Vale ressaltar que essas bactérias não foram encontradas somente na superfície do osso, mas também em toda a sua extensão, visualizada por meio de cortes transversais (SEDGHIZADEH et al., 2008; SEDGHIZADEH et al., 2009).

Em indivíduos sem alterações sistêmicas, a presença de tais bactérias resultam na destruição tecidual e a reabsorção óssea alveolar (KINANE, 2001; VAN DYKE & SERHAN, 2003; ROGERS et al, 2009; VAN DYKE, 2008). Em indivíduos que fazem uso de bifosfonatos e são portadores de DP esta intensa atividade reabsortiva pode atrair um grande número moléculas de bisfosfonatos para o osso alveolar, uma vez que o fármaco se concentra em áreas de intensa remodelação. Sugere-se que a resposta ocasionada pela doença periodontal e a íntima relação entre o bisfosfonato e a cessação da reabsorção óssea dos maxilares desses pacientes, tenham um efeito sinérgico na formação de um osso acelular e necrótico, que poderá ser agravada se houver manipulação cirúrgica dos tecidos moles (MARX et al., 2005) culminando na BRONJ. Pacientes com doença periodontal concomitante tem 7 vezes mais risco de desenvolverem BRONJ.

O tratamento periodontal inicial ou básico é realizado por meio da remoção de biofilme, depósitos bacterianos calcificados da superfície dos dentes e de suas raízes, por meio de procedimentos de raspagem e alisamento radicular. A eliminação das bactérias permite que o tecido mole possa se recuperar e

reorganizar, controlando a progressão da doença. Ainda é considerado o meio mais eficiente de controle da doença (IOANNOU et al., 2009; MATTHEWS et al., 2009).

A realização da terapia periodontal básica, realizada com instrumentos mecânicos convencionais muitas vezes pode ser prejudicada pelo acesso incompleto às bolsas periodontais e a desinfecção destas áreas de doença pode ser incompleta. A utilização do laser como adjunto à terapia mecânica pode trazer benefícios importantes ao tratamento da DP. O laser possui efeito bactericida, promove a remoção do tecido de granulação, promovendo melhor cicatrização local do tecido periodontal (ELAVARASU et al., 2012).

Os resultados da aplicação de laser na terapia periodontal têm sido relatados com resultados positivos. Neil & Melloning (1997) mostraram que os pacientes que foram tratados com o laser Nd:YAG juntamente com raspagem e alisamento radicular tiveram uma diminuição do índice gengival comparados com aqueles que não fizeram laser terapia, e ainda um ganho na aderência periodontal. Ensaio clínico controlado e relatos de casos realizados por Ishikawa et al., 2003, demonstraram que o tratamento periodontal com um laser de érbio leva ao ganho de inserção clínica significativa.

Estudos mostram que a laser terapia deve atuar como um tratamento coadjuvante e não de substituição para o tratamento padrão, representado pela raspagem e alisamento radicular (Neil & Melloning, 1997; Bader, 2000). A curetagem das bolsas periodontais com laser não é eficaz se não se fizer uma raspagem e alisamento radicular, para eliminação das bactérias das superfícies radiculares.

As opções de tratamento da BRONJ descritas na literatura variam conforme a área médica de abordagem. Clark et al., (2007) concluíram, que não existe um tratamento único que seja eficaz e sugere que a combinação de ciclos de antibioticoterapia com tratamentos cirúrgicos simples oferece a melhor hipótese de cura. Assim, antes de iniciar a terapêutica com bifosfonatos intravenosos, o doente deve ser submetido a um exame cuidadoso da cavidade oral, com otimização da saúde periodontal (LOPES, 2009).

Considerando-se o crescente número de casos de BRONJ (MARX et al, 2009) e da alta prevalência de doença periodontal na população adulta, o presente

estudo pretende verificar a ação do procedimento de raspagem e alisamento radicular associado à laser terapia de baixa potência (LTB) no tratamento da doença periodontal, em ratos tratados com ácido zoledrônico.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o padrão histológico do reparo periodontal quando animais são submetidos à terapia endovenosa com zolendronato, associada ao laser de baixa intensidade.

### **2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO**

- Analisar o padrão histológico de reparação da doença periodontal frente à administração do bisfosfonato, da aplicação da LTB bem como da associação de ambos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

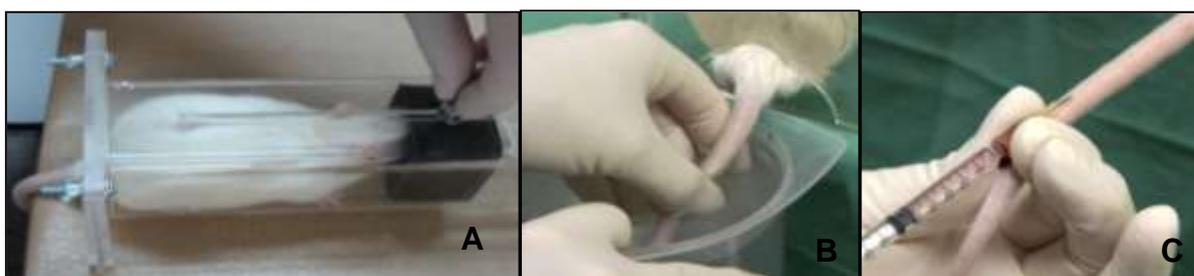
Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Sagrado Coração, sob protocolo nº 001/13.

#### 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados para este experimento 45 ratos *Wistar* machos, pesando entre 350g e 400g, com idade de 5 meses. Todos os animais receberam cuidados humanos, em um ambiente controlado com temperatura de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  e ciclo de claro-escuro de 12 horas. Os animais tiveram livre acesso à ração padrão (22% de proteína bruta, 1,4% de cálcio, 0,6% de fósforo e micronutrientes em concentrações adequadas) e água *ad libitum*. Os ratos foram acondicionados em caixas plásticas (5 ratos por caixa) e foram aleatoriamente divididos em 3 grupos:

- (G1) Controle com doença periodontal;
- (G2) Aplicação de zoledronato com doença periodontal;
- (G3) Aplicação de zoledronato, doença periodontal e LTB.

Cada grupo contou com uma amostragem de 5 animais cada, seguindo os tempos de análise de 7, 14 e 28 dias. Os animais do grupo 2 e 3 que foram tratados com bifosfonatos, receberam a dose de 35 mg/kg de zoledronato (Blaztere®) em 0,9% de NaCl por via endovenosa (EV), com total de 5 aplicações de 15 em 15 dias (HOKUGO et al., 2010).



**Figura 1:** A) dispositivo para aplicação EV do medicamento; B) água morna para evidenciar a veia; C) aplicação do medicamento EV;

Os animais que desenvolveram doença periodontal foram submetidos ao procedimento de ligadura dental, para o desenvolvimento da doença, após a 3ª aplicação do medicamento. Sete dias após, a ligadura foi removida, e na mesma sessão, os animais foram submetidos ao procedimento de RAR, realizados com

cureta de Gracey. No grupo 4, além da RAR, os animais foram submetidos à aplicação da LTB. Ao grupo controle, com doença periodontal, foi aplicado soro fisiológico EV e submetidos ao procedimento de ligadura dental, sendo manipulados da mesma maneira que os animais dos demais grupos.

### 3.2 LIGADURA DENTAL

Para a realização do procedimento de ligadura dental foi utilizado um suporte adaptado para manter o animal com a boca aberta, posicionando a língua de tal forma que deixe livre o acesso ao primeiro molar inferior. Este procedimento foi realizado sob anestesia geral, realizada com quetamina e xilazina. O primeiro molar inferior esquerdo de cada animal recebeu uma ligadura com linha de algodão número 20, posicionado delicadamente no sulco gengival (GRAVES et al., 2008). Após 7 dias, a ligadura foi removida, e o tratamento proposto foi iniciado.

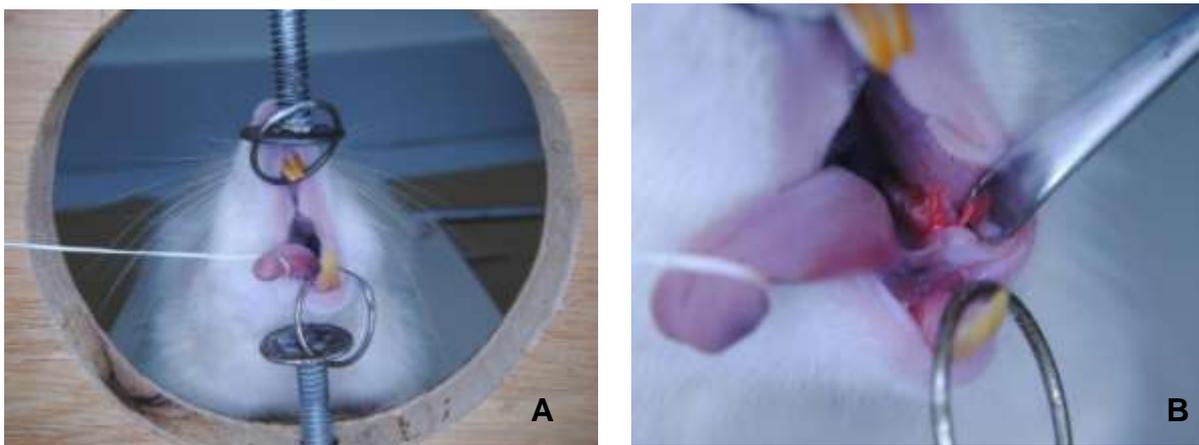


Figura 2: A - Posicionamento do animal para realização da amarra; B - Amarra realizada no 1º molar inferior esquerdo



Figura 3: Amarra após sete dias da instalação. Observar o acúmulo de placa bacteriana encontrado sobre a linha.

### 3.3 LASERTERAPIA

O grupo 4, após realizar a RAR, foram submetidos à aplicação da LLLT (AlGaAs –  $\lambda$  808 nm, CW, 30 mW, de 0,028 cm<sup>2</sup>). A irradiação com laser foi iniciada imediatamente após a RAR e depois de cada 48 h durante 7 dias. Foi realizada transmucosa, com a ponta de laser em contato com o tecido, sem pressão, em 4 pontos: mesial, distal, vestibular e lingual do molar, regularmente distribuída sobre a superfície com um tempo de irradiação de 15 s, e uma dose de 16 J/ cm<sup>2</sup> em cada ponto, dando um total de 64 J/cm<sup>2</sup> por sessão (PINHEIRO et al., 2003).

### 3.4 EUTANÁSIA ANIMAL E PREPARAÇÃO DO TECIDO

Todos os animais foram eutanasiados seguindo os períodos de análise de cada grupo (7, 14 e 28 dias), por inalação de CO<sub>2</sub>. Em sequência, as mandíbulas foram removidas e pré-fixadas em formalina a 10%, neutra e tamponada, por 96 horas. Após este período, foi iniciada a descalcificação em EDTA a 10%. Com a completa descalcificação, a mandíbula foi seccionada longitudinalmente. Em seguida, a peça foi processada pela técnica de inclusão em parafina. As secções histológicas foram cortadas a 4 $\mu$ m e foram coradas pela técnica da hematoxilina-eosina e Goldner para avaliação histomorfométrica.

### 3.5 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Imagens das características estruturais do tecido periodontal foram adquiridas utilizando microscopia ótica de luz (Microscópio Nikon, Eclipse 80i. Japão). Medidas dos parâmetros morfométricos foram realizadas usando o *software Image PRO PLUS* para Windows 5.0 (*Media Cybernetics, Inc, Silver Spring, MD, USA*). As medidas foram:

- Distância entre junção cimento-esmalte e a crista óssea (será traçada uma linha reta entre o 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> molar, na região entre a junção amelo-cementária (JAC) e outra linha perpendicular a esta, partindo da crista óssea alveolar (COA) (WILLIAMS et al., 1985).
- Distância entre o centro da região de furca e o ponto central do tecido ósseo localizado na região.

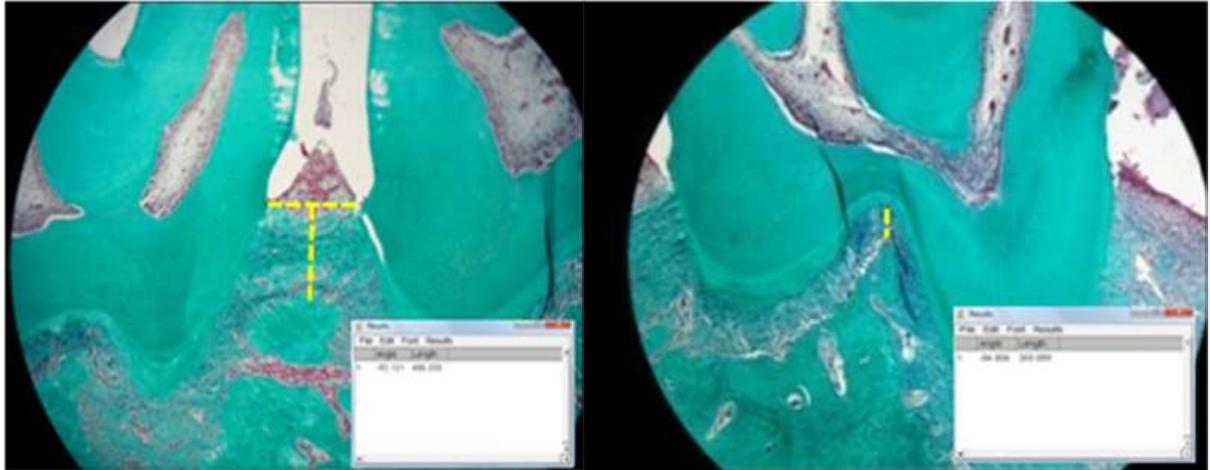


Figura 3: A - Distância entre junção cimento-esmalte e a crista óssea. B - Distância entre o centro da região de furca e o ponto central do tecido ósseo localizado na região.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por meio do teste de análise de variância (ANOVA) seguido do Teste de Tukey. Para todas as análises, valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 4 RESULTADOS

Os cortes histológicos e as análises morfométricas foram realizados por um único examinador.

- Crista óssea

As medidas obtidas da região analisada estão dispostas na Tabela 1. O único momento no qual foi observada diferença significativa entre os grupos analisados foi no período de 7 dias, indicando maior perda óssea quando o zolendronato foi utilizado (G2 e G3) (Fig.1).

Tabela 1 – Medida da perda óssea na região de crista óssea alveolar

DIAS	CONTROLE	ZL	ZL + LTB
7 dias	650±106,69	1004,56±108,97*	1402,66±256,74*
14 dias	1276,53±201,87	1755,37±369,61	1444,01±338,22
28 dias	1428,53±203,40	1403,98±223,48	1324,91±270,42

\* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

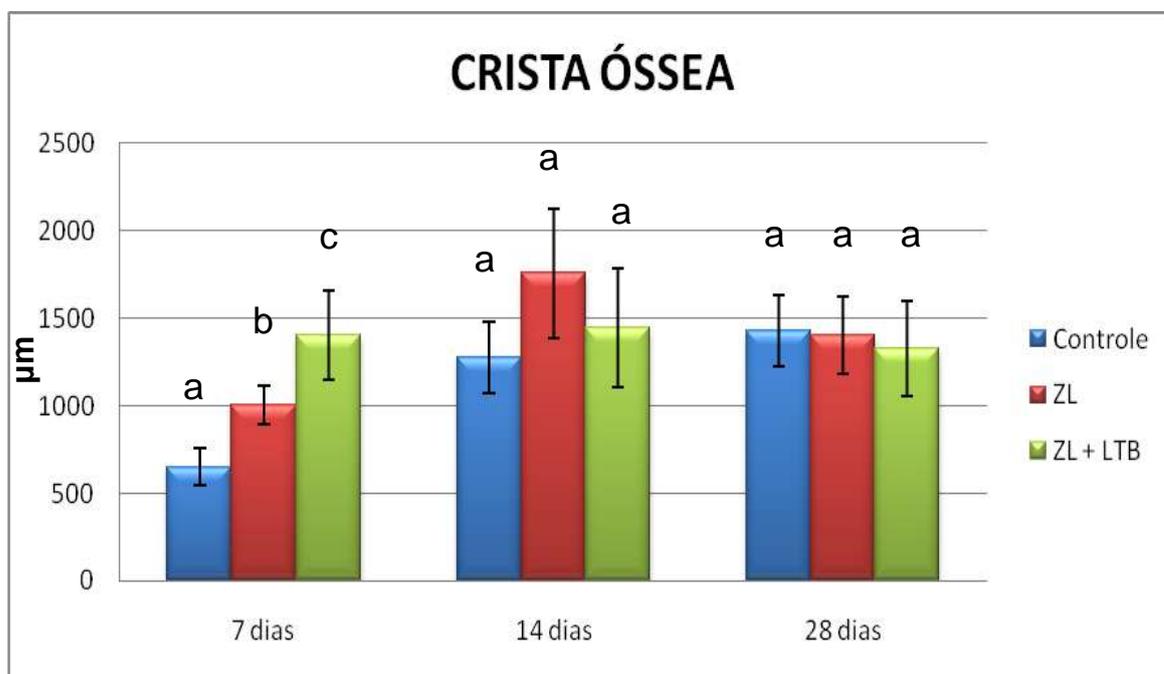


Figura 4 – Comparação entre os diferentes tratamentos, nos períodos de 7 (A), 14 (B) e 28 (C) dias. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

- Furca

As medidas obtidas da região analisada estão dispostas na Tabela 2. Diferença significativa foi observada aos 7 dias, entre os grupos analisados, indicando maior perda óssea nos grupos que receberam zolendronato; e aos 28 dias, mostrando diminuição na perda óssea quando o zolendronato foi aplicado (Fig.2).

Tabela 2 – Medida da perda óssea na região de furca

DIAS	CONTROLE	ZL	ZL + LTB
7 dias	293,09±110,96	453,36±42,20*	606,06±63,17*
14 dias	422,4±163,92	901,83±321,13	862,81±364,76
28 dias	1128,29±129,45	673,14±224,48*	539,17±181,37*

\* Diferença estatisticamente significante ( $p < 0,05$ )

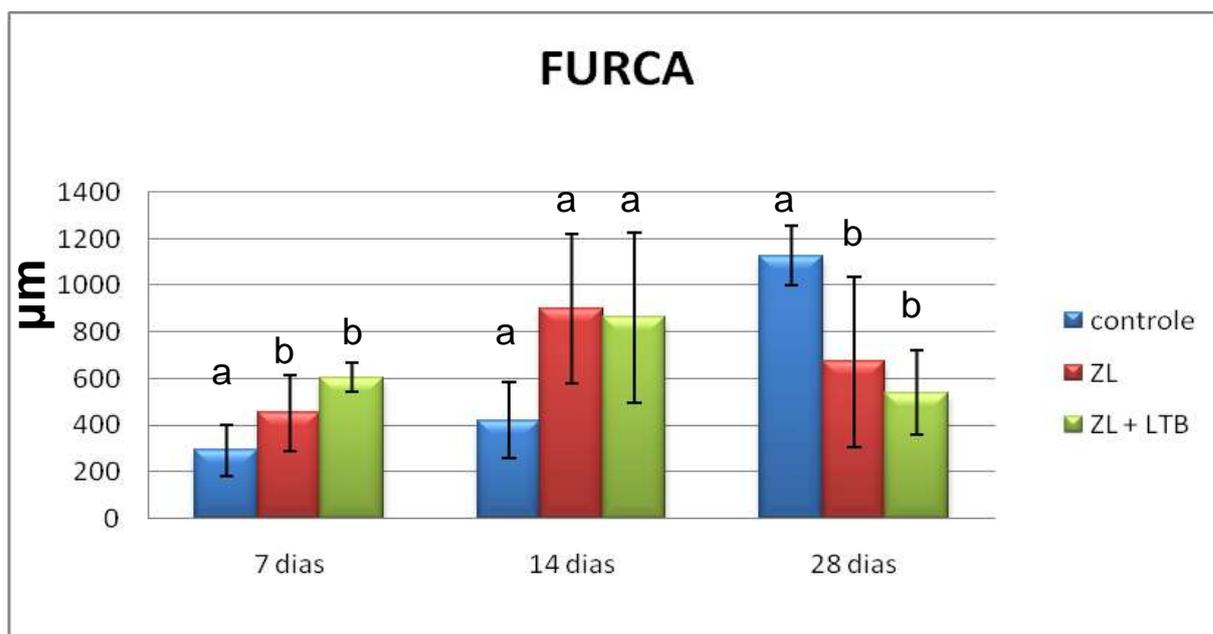


Figura 5 – Comparação entre os diferentes tratamentos, nos períodos de 7 (A), 14 (B) e 28 (C) dias. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

A análise histológica dos grupos analisados mostrou uma alteração do tecido epitelial, provocada pelo zolendronato. O padrão histológico do epitélio oral do grupo controle (sem o medicamento) apresenta organização do tecido epitelial, com queratinócitos produzindo camadas uniformes de queratina (Fig.3A). Já nos grupos

que utilizaram zolendronato, o epitélio sofre alterações estruturais, com a presença de ilhotas de tecido conjuntivo, desorganização dos queratinócitos, e alteração no padrão de formação de queratina (Fig.3B eC)

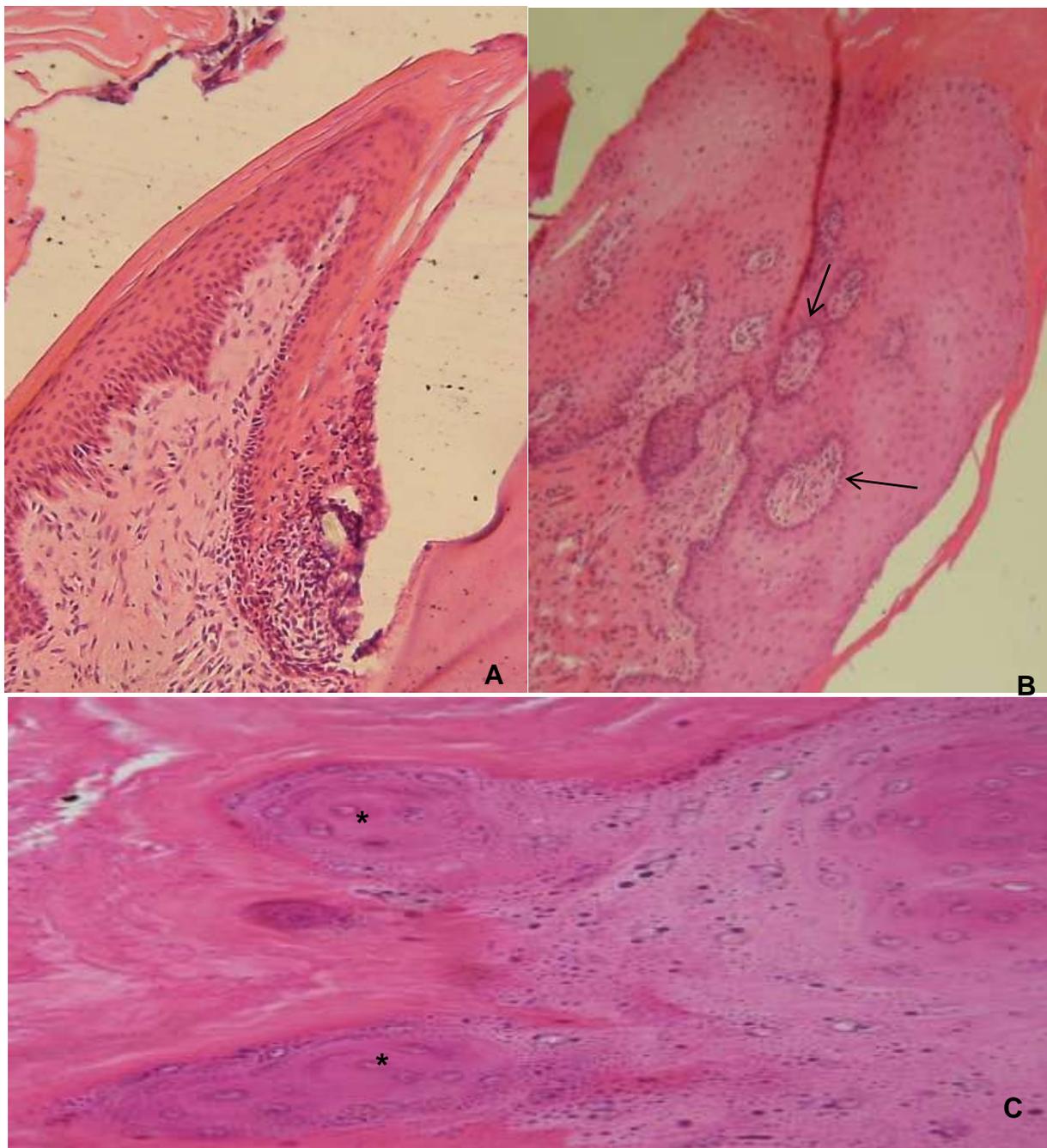


Figura 6 - Em A, organização do tecido epitelial, no grupo que não utilizou o zolendronato, mostrando características de normalidade. Em B e C, nota-se as alterações epiteliais produzidas pelo zolendronato. Em B, observa-se a formação de ilhotas de tecido conjuntivo no interior do epitélio (setas). Em C, projeções de queratinócitos, evidenciando desorganização e formação irregular de queratina (\*). (A-aumento de 4x, B-aumento de 10x e C-aumento de 40x, HE).

## 5 DISCUSSÃO

A terapia com bifosfonatos tem contribuído para o tratamento de doenças malignas e diminuição de complicações esqueléticas. Devido ao seu efeito anti-reabsortivo que atua pela afinidade do fármaco com o mineral ósseo, (propriedades de ligação mineral) e pelos efeitos inibitórios sobre osteoclastos (efeito celular), essas propriedades variam de acordo com a classificação do fármaco e dentre os mais potentes estão o pamidronato e o zolendronato (RUSSELL et al.,2008; HOKUGO et al., 2012).

No entanto o uso desse fármaco tem levado a uma condição clínica chamada BRONJ, sendo mais comum em pacientes que fazem o uso EV, entretanto, os trabalhos têm demonstrado a presença dessa condição também em pacientes que fazem o uso de fármacos menos potentes, como o alendronato, para tratamento de osteoporose com o uso prolongado. (RUSSELL et al.,2008; HOKUGO et al., 2012; MARX et al., 2005).

A princípio a BRONJ é uma condição patológica que atinge apenas os ossos dos maxilares, não envolvendo os ossos longos e/ou esqueleto axial. Para entender a susceptibilidade dessa região pesquisas verificaram a diferença entre os ossos dos maxilares e os outros ossos do corpo e sua relação com os patógenos. Dessa forma, observou-se que a mesma osteonecrose que acontece nos ossos dos maxilares, também ocorre em outros ossos do corpo quando há um estímulo inflamatório, o que foi observado em modelo animal (TSURUSHIMA, et al. 2013; AGUIRRE et al, 2012).

Contudo, os ossos dos maxilares são mais susceptíveis a estímulos inflamatórios sendo os únicos cobertos por uma mucosa que tem uma relação contígua com o ambiente externo através do órgão dentário, onde possui uma relação vulnerável com o meio por estar em meio interno e em meio externo, sendo facilmente rompida e sofrendo infecções bacterianas, principalmente pelas periodontopatógenas. Desta forma, desenvolvem as condições específicas para o desenvolvimento da BRONJ nos maxilares (TSURUSHIMA, et al. 2013;CHUNG, et al., 2007).

Considerando que a maioria das lesões de BRONJ em pacientes ocorre após a extração dentária, e que uma das principais indicações de extração em adultos é a doença periodontal avançada, logo a intensa atividade inflamatória gerada pelas bactérias causará uma intensa remodelação óssea que culminará na atração de um grande número de moléculas de bifosfonatos para o osso alveolar (MARX et al, 2005; PETERSEN & OGAWA, 2005; ALBANDAR et al., 1999). Esta estreita associação entre a doença periodontal e a atração de moléculas de bifosfonatos revelou alterações significativas na morfologia óssea alveolar em animais. Análises realizadas neste estudo demonstraram que as imagens radiográficas de BRONJ desenvolvida nos pacientes são muito semelhantes à desenvolvida no animal, levando a estabelecer uma ligação entre a doença periodontal e o início da necrose óssea que evoluirá para a extração dentária, com posterior exposição óssea da cavidade, BRONJ (AGHALOO et al., 2011).

Partindo do pressuposto que o desenvolvimento da osteonecrose inicia antes da exposição óssea da cavidade, e que o início da necrose óssea depende de um estímulo inflamatório que pode estar estritamente associado à doença periodontal ativa, nos chama atenção a propor a exploração de propostas de tratamento.

Mediante ao relatado, o presente trabalho propôs desenvolver a osteonecrose em ratos, através de aplicação de zolendronato EV e a realização de ligadura em torno do primeiro molar inferior esquerdo para indução da DP, onde após 7 dias procedeu-se a sua remoção. Neste modelo a proposta de tratamento foi realizar a remoção da ligadura e na mesma sessão efetivar o procedimento de RAR (única) e aplicação da LTB em um dos grupos, visando avaliar o padrão histológico do reparo periodontal.

De acordo com estudos anteriores o grupo controle apresentou uma perda óssea alveolar significativa na crista óssea (GRAVES et al., 2008) e quando o zolendronato foi utilizado observou-se uma diferença significativa entre os grupos analisados no período de 7 dias, indicando maior perda óssea, demonstrado em pesquisa (AGHALOO et al., 2011). A perda óssea na região de furca também foi analisada e demonstrou diferença significativa aos 7 dias entre os grupos, indicando

maior perda óssea nos grupos que receberam zl; e aos 28 dias, mostrando diminuição na perda óssea quando o zl foi aplicado.

Na lesão de furca aos 28 dias ocorre a inversão dos resultados com uma maior proteção da reabsorção no grupo zl, devido ao seu efeito anti-reabsortivo podendo controlar a modulação da reabsorção óssea (BRADAN, et al. 2008; LLAVANERAS, et al., 2001).

A utilização do LTB na doença periodontal associado ao uso de bifosfonatos não demonstrou melhora na reabsorção óssea, o que pode ser devido à ação bioestimuladora do laser que aumenta a proliferação celular e consequentemente o processo de reparo (ELAVARASU, NAVEEN e THANGAVELU, 2012; KHADRA et al., 2003; PINHEIRO et al., 2003). No entanto sabe-se que a intensa atividade celular atrai um grande número moléculas de bifosfonato, o que acentuou a perda óssea devido à necrose (MARX et al, 2005).

Contudo a RAR ocorreu apenas no dia da remoção da ligadura o que tornou o sítio favorável ao acúmulo de placa e a aplicação do laser não seria o suficiente para controlar a reabsorção óssea. Dessa forma, mesmo com a presença de placa o LTB conseguiu manter-se, não significativamente, abaixo do zl.

Portanto, o zl mostrou alterar o padrão de reparo periodontal, produzindo maior perda de tecido ósseo nos períodos iniciais, mas reverteu o processo nos períodos mais longos (crista alveolar e furca). Embora o LTB possua efeito bactericida, promovendo melhor cicatrização do tecido periodontal (ELAVARASU, NAVEEN e THANGAVELU, 2012), a RAR deveria anteceder todas as aplicações do laser e poderia ser associado a bochechos com gluconato de clorexidina 0,12%, com o intuito de propor um tratamento mais próximo ao oferecido a seres humanos e para verificar com maior precisão o padrão de reparo periodontal.

A análise histológica (coloração H.E.) demonstrou alteração do tecido epitelial provocada pelo zl, que é tóxico ao tecido mole (LANDESBURG et al., 2008). Essa toxicidade dos bifosfonatos é um fator importante para o desenvolvimento da BRONJ, pois leva os queratinócitos da mucosa oral a apoptose, diminuindo o crescimento das células epiteliais e cura da ferida (RESZKA, 2001; LANDESBURG et al., 2008).

No grupo controle (sem o medicamento) o padrão histológico do epitélio oral é organizado, com queratinócitos produzindo camadas uniformes de queratina. Já nos grupos que utilizaram zI o epitélio sofre alterações estruturais, com a presença de ilhotas de tecido conjuntivo, desorganização dos queratinócitos, e alteração no padrão de formação de queratina.

A reabsorção óssea deve ser considerada como um fator significativo para o desenvolvimento da BRONJ, pois a inibição dos osteoclastos gera alterações na estrutura óssea e a toxicidade do bifosfonato altera as células do epitélio oral que estão mais susceptíveis a infecções. Desta forma o estudo proposto demonstrou que o zI alterou o padrão de reparo periodontal, produzindo maior perda de tecido ósseo nos períodos iniciais, porém reverteu o processo nos períodos mais longos. O tratamento com o LTB não apresentou uma melhora tecidual.

## **6 CONCLUSÃO**

Em conclusão, o zolendronato alterou o padrão de reparo periodontal, produzindo maior perda de tecido ósseo nos períodos iniciais, mas reverteu o processo nos períodos mais longos, mediante a sua ação protetora. Embora a aplicação do laser de baixa intensidade associado ao zolendronato não apresente melhora no reparo tecidual, pode-se notar uma menor perda óssea, sendo não significativa.

Entretanto, mesmo que o reparo tecidual não tenha sido significativo com a aplicação do laser, podendo ter sido influenciado pelo acúmulo de placa após a primeira RAR e assim prejudicando sua ação, fica ainda em aberto a possibilidade da aplicação do laser como coadjuvante ao reparo tecidual em pacientes que fazem o uso de bifosfonatos.

## REFERÊNCIAS

AGHALOO, T.L.; KANG, B.; SUNG, E.C.; SHOFF, M.; RONCONI, M.; GOTCHER, J.E.; BEZOUGLAIA, O.; DRY, S.M.; TETRADIS, S. Periodontal Disease and Bisphosphonates Induce Osteonecrosis of the Jaws in the Rat. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, No. 8, p. 1871–1882, 2011.

AGUIRRE, J. I.; AKHTER, M.P.; KIMMEL, D.B.; PINGEL, J. E.; WILLIAMS, A. JORGENSEN, M.; KESAVALU, L.; WRONSKI, T. J. Oncologic Doses of Zoledronic Acid Induce Osteonecrosis of the Jaw-Like Lesions in Rice Rats (*Oryzomys palustris*) With Periodontitis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, No. 10, p. 2130–2143, 2012.

ALBANDAR, J. M.; BRUNELLE, J. A.; KINGMAN, A. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. **J Periodontol**, v.70, p.13-29, 1999.

BADER, H. Use of lasers in periodontics. **Dent Clin North Am**, v.44, p.779-791, 2000.

BAGAN, J.V.; JIMENEZ, Y.; MURILLO, J.; HERNANDEZ, S.; POVEDA, R.; SANCHIS, J.M.; DIAZ, J.M.; SCULLY, C. Jaw osteonecrosis associated with bisphosphonates: multiple exposed areas and its relationship to teeth extractions. Study of 20 cases. **Journal Oral Oncology**, v.42, p.327-329, 2006.

BAMIAS, A.; KASTRITIS, E.; BAMIA, C.; MOULOPOULOS, L.A.; MELAKOPOULOS, I.; BOZAS, G.; KOUTSOUKOU, V.; GIKA, D.; ANAGNOSTOPOULOS, A.; PAPADIMITRIOU, C.; TERPOS, E.; DIMOPOULOS, M.A. Osteonecrosis of the Jaw in Cancer After Treatment With Bisphosphonates: Incidence and Risk Factors. **J Clin Oncol**, v.23, p.8580-8587, 2005.

BADRAN, Z.; KRAEHENMANN, MA; GUICHEUX, J, SOUEIDAN, A. Bisphosphonates in Periodontal Treatment: A Review. **Oral Health Prev Dent**, v. 7, p. 3–12, 2008.

CLARK, B.; BOYETTE, J.; VURAL, E.; SUEN, J.; ANAISSIE, E.; STACK, B. Bisphosphonates and jaw osteonecrosis: the UAMS experience. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v.136, p.396-400, 2007.

COXON, E. P., TOMPSON, K., ROGERS, M. J. Recent advances in understanding the mechanism of action of biphosphonates. **Curr Opin Pharmacol**, v.6, p.307-312, 2006.

CHUNG, W.O.; DOMMISCH, Y.L.; DALE, B.A. Expression of defensins in gingiva and their role in periodontal health and disease. **Curr Pharm Des**. v. 13 (30), p. 3073-83, 2007.

DARVEAUN, R. P., TANNER, A., PAGE, R. C. The microbial challenge in periodontitis. **Periodontology** 2000, v.14, p.12-32, 1997.

DIMITRAKOPOULOS, I. C., MAGAPOULOS, D. K. Bisphosphonates-induced avascular osteonecrosis of the jaws: a clinical report of 11 cases. **J. Oral Maxillofac Surg**, v.35, p.588-593, 2006.

DIMOPOULOS, M.A.; KASTRITIS, E.; BAMIA, C.; MELAKOPOULOS, I.; GIKA, D.; ROUSSOU, M.; MIGKOU, M.; ELEFTHERAKIS-PAPAIKOVOU, E.; CHRISTOULAS, D.; TERPOS, E.; BAMIAS, A. Reduction of osteonecrosis of the jaw (ONJ) after implementation of preventive measures in patients with multiple myeloma treated with zoledronic acid. **Annals of Oncology**, v.20 p.117–120, 2009.

ELAVARASU, S.; NAVEEN, D.; THANGAVELU, A. Lasers in periodontics. **J Pharm Bioallied Sci**, v.4, p.S260-263, 2012.

FICARRA, G.; BENINATI, F. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: an update on clinical, pathological and management aspects. **Head Neck Pathol**, v.1, p.132-40, 2007.

GOYTIA, R.N.; SALAMA, A; KHANUJA, H.S. Bisphosphonates and Osteonecrosis: Potential Treatment or Serious Complication. **Orthop Clin N Am**, p.223-224, 2009.

GRAVES, D.T.; FINE, D.; TENG, Y.T.; VAN DYKE, T.E; HAJISHENGALLIS, G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interaction related to periodontal diseases. **J Clin Periodontol**, v.35, p.89-105, 2008.

GREENSTEIN, G. Nonsurgical periodontal therapy in 2000: A literature review. **The journal of the American Dental Association**, v.131, p.1580-1592, 2000.

HOKUGO, A.; CHRISTENSEN, R.; CHUNG, E.M.; SUNG, E.C.; FELSENFELD, A.L.; SAYRE, J.W.; GARRETT, N.; ADAMS, J.S.; NISHIMURA, I. Increased Prevalence of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw with Vitamin D Deficiency in Rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.25, p.1337–1349, 2010.

HOKUGO, A; SUN, S; PARK, S; MCKENNA, C; NISHIMURA, I. Equilibrium-dependent bisphosphonate interaction with crystalline bone mineral explains anti-resorptive pharmacokinetics and prevalence of osteonecrosis of the jaw in rats. **Bone**, v. 53, p. 59–68, 2012.

IOANNOU, I.; DIMITRIADIS, N.; PAPADIMITRIOU, K.; SAKELLARI, D.; VOUIROS, I.; KONSTANTINIDIS, A. Hand instrumentation versus ultrasonic debridement in the treatment of chronic periodontitis: a randomized clinical and microbiological trial. **J Clin Periodontol**, v.36, p.132-141, 2009.

ISHIKAWA, I.; SASAKI, K.M.; AOKI, A.; WATANABE, H. Effects of Er:YAG laser on periodontal therapy. **J Int Acad Periodontol**, v.5, p.23-28, 2003.

KINANE, D. F. Causation and pathogenesis of periodontal disease. **Periodontology** **2000**, v.25, p.8-20, 2001.

LANDESBERG, R.; COZIN, M.; CREMERS, S.; WOO, V.; KOUSTENI, S.; SINHA, S.; GARRETT-SINHA, L.; RAGHAVAN, S. Inhibition of Oral Mucosal Cell Wound Healing by Bisphosphonates. **J Oral Maxillofac Surg**, v.66, p.839–847, 2008.

LLAVANERAS; A.; RAMATMURTHY, N.S.; HEIKKILA, P.; TERONEN, O.; SALO, T.; RIFKIN, B.R.; RYAN, M.E.; GOLUB, L.M.; SORSA, T. A combination of a chemically modified doxycycline and a biphosphonate synergistically inhibits endotoxin-induced periodontal breakdown in rats. **J. Periodontol.** v. 72 (8) 1069-77, 2001.

LO, J.C.; O'RYAN, F.S.; GORDON, N.P.; YANG, J.; HUI, R.L.; MARTIN, D.; HUTCHINSON, M.; LATHON, P.V.; SANCHEZ, G.; SILVER, P.; CHANDRA, M.; MCCLOSKEY, C.A.; STAFFA, J.A.; WILLY, M.; SELBY, J.V.; GO, A.S. Predicting Risk of Osteonecrosis of the Jaw with Oral Biphosphonate Exposure (PROBE) Investigators. Prevalence of osteonecrosis of the jaw in patients with oral bisphosphonate exposure. **J Oral Maxillofac Surg**, v.68, p.243- 253, 2010.

LOPES, E.; SENHA, H.; COSTA, H.; BARROSO, J. Osteonecrose da Mandíbula Associada ao Uso de Bifosfonatos. Uma Patologia Secundária Grave. **Arq Med**, v.23, n.5, 2009.

MARX, R.E.; SAWATARI, Y.; FORTIN, M.; BROUMAND, V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. **J. Oral Maxillofac Surg**, v.33, p.1567-1575, 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**, v.65, p.2397-2410, 2007.

MARX, R. Reconstruction of Defects Caused by Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaws. **American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v.67, p.107-119, 2009.

MATTHEWS, J.; JOKSTAD, A.; CLARKSON, J. Weak evidence suggests scaling and root planing may help people with diabetes improve glycemic control. **J American Dental Association**, v.140, p.1144 – 1145, 2009.

NEILL, M.E.; MELLONING, J.T. Clinical efficacy of the Nd: YAG laser for combination periodontitis therapy. **Pract Periodontics Aesthetic Dent**, v.9, p.1-5, 1997.

OTTO, S.; ABU-ID, M.H.; FEDELE, S.; WARNKE, P.H.; BECKER, S.T.; KOLK, A.; et al. Osteoporosis and bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw: Not just a sporadic coincidence e a multi-centre study. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v. 39, p.272-277, 2011.

PETERSEN, P.E.; OGAWA, H. Strengthening the Prevention of Periodontal Disease: The WHO Approach. **J Periodontol**, v.76, p.2187- 2193, 2005.

PINHEIRO, A.L.; LIMEIRA JÚNIOR, F.D.E.A.; GERBI, M.E.; RAMALHO, L.M.; MARZOLA, C.; PONZI, E.A.; SOARES, A.O.; DE CARVALHO, L.C.; LIMA, H.C.; GONÇALVES, T.O. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. **J Clin Laser Med Surg**, v.2, p.383–388, 2003.

RESZKA, A.A.; HALASY-NAGY, J.; RODAN, G.A. Nitrogen-Bisphosphonates Block Retinoblastoma Phosphorylation and Cell Growth by Inhibiting the Cholesterol Biosynthetic Pathway in a Keratinocyte Model for Esophageal Irritation. **Mol Pharmacol**, v.59, p.193–202, 2001.

ROGERS, J. E.; LI, F.; COATNEY, D.D.; ROSSA, C.; BRONSON, P.; KRIEDER, J.M.; GIANNOBILE, W.V.; KIRKWOOD, K.L. Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. **J. Periodontol**, v.78, p.1259-1265, 2009.

RUGGIERO, S.L.; MEHROTRA, B.; ROSENBERG, T.J.; ENGROFF, S.L. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. **J. Oral Maxillofac Surg**, v.62, p.527-534, 2004.

RUGGIERO, S.L.; DODSON, T.B.; ASSAEL, L.A.; LANDESBURG, R.; MARX, R.E.; MEHROTRA, B. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws—2009 Update. **J Oral Maxillofac Surg**. v. 67, p. 2-12, 2009.

RUSSELL, RG; WATTS, NB; EBETINO, FH; ROGERS, MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. **Osteoporos Int**. v.19 p.733–59, 2008.

SARATHY, A. P., BOURGEOSIS, Jr., GOODELL, G. G. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws and endodôntico treatment: two case reports. **JOE**, v.31, p.759-763, 2005.

SEDGHIZADEH, P.P.; KUMAR, S.K.; GORUR, A.; SCHAUDINN, C.; SHULER, C.F.; COSTERTON, J.W. Identification of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy. **American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v.66, p.767-775, 2008.

SEDGHIZADEH, P.P.; KUMAR, S.K.; GORUR, A.; SCHAUDINN, C.; SHULER, C.F.; COSTERTON, J.W. Microbial biofilms in osteomyelitis of the jaw and osteonecrosis of the jaw secondary to bisphosphonate therapy. **The journal of the American Dental Association**, v.140, p.1259-1265, 2009.

VAN DYKE, T. E., SERHAN, C.N. Resolution of inflammation: A new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. **Journal of Dental Research**, v. 82, p. 82-90, 2003.

VAN DYKE, T.E., The Management of Inflammation in Periodontal Disease. **J Periodontol**. v. 79(8 Suppl) p.1601–1608, 2008.

TSURUSHIMA, H; KOKURYO,S; SAKAGUCHI,O; TANAKA,J; TOMINAGA, K. Bacterial promotion of bisphosphonate-induced osteonecrosis in Wistar rats. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.** p.07, 2013.

ZIJNGE, V.; VAN LEEUWEN, M.B.; DEGENER, J.E.; ABBAS, F.; THURNHEER, T.; GMÜR, R.; HARMSSEN, H.J. Oral Biofilm Architecture on Natural Teeth. **Plos one**, v.5, p.1-9, 2010.