

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

LETÍCIA RODRIGUES PIRES

ALTERAÇÕES NO PERIODONTO DE RATOS TRATADOS COM
BISFOSFONATO NITROGENADO POR VIA ENDOVENOSA

BAURU

2019

LETÍCIA RODRIGUES PIRES

ALTERAÇÕES NO PERIODONTO DE RATOS TRATADOS COM
BISFOSFONATO NITROGENADO POR VIA ENDOVENOSA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Odontologia - Universidade do Sagrado Coração sob orientação da Prof.^a Dra. Mirella Lindoso Gomes Campos e coorientação da Prof.^a Dra. Andreia Aparecida da Silva.

BAURU

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

A347t	<p>Pires, Letícia Rodrigues</p> <p>Alterações no Periodonto De Ratos Tratados Com Bisfosfonato Nitrogenado Por Via Endovenosa -- 2019. 32f. : il.</p> <p>Orientadora: Prof.^a Mirella Lindoso Gomes Campos. Coorientadora: Andreia Aparecida da Silva.</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP</p> <p>1. Bisfosfonato. 2. Ligamento Periodontal. 3. Periodonto. 4. Osteonecrose. 5. Odontologia.</p>
-------	--

LETÍCIA RODRIGUES PIRES

ALTERAÇÕES NO PERIODONTO DE RATOS TRATADOS COM
BISFOSFATO NITROGENADO POR VIA ENDOVENOSA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte dos
requisitos para obtenção do título de
bacharel em Odontologia -
Universidade do Sagrado Coração
sob orientação da Prof.^a Dra. Mirella
Lindoso Gomes Campos e
coorientação da Prof.^a Dra. Andreia
Aparecida da Silva.

Aprovado em: ___/___/___.

Banca examinadora:

Prof^a Dra. Mirella Lindoso Gomes Campos
(Orientadora)
Universidade do Sagrado Coração

Prof.^a Dra. Elcia Maria Varize Silveira
Universidade do Sagrado Coração

Prof^a Dr. José Fernando Scarelli Lopes
Universidade do Sagrado Coração

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me sustentado até aqui. Sem a fé eu não conseguiria persistir nos momentos mais difíceis. Agradeço aos meus pais por todo suporte e paciência, obrigada por lutarem e acreditarem no meu potencial.

Aos meus amigos, por me motivarem a todo o momento e deixarem meus dias mais leves. À minha irmã, por ser companheira. E ao meu namorado, que lutou junto comigo pra que tudo desse certo, você foi essencial pra que tudo isso acontecesse.

Agradeço à professora Dra Patrícia Saraiva por acreditar no meu potencial desde o começo e à professora Dra Mirella Lindoso Gomes Campos, por me acolher nessa reta final com tanto carinho.

Aos professores, Dra. Elcia Maria Varize Silveira e Dr. José Fernando Scarelli Lopes por todo o ensinamento: vocês são minha grande inspiração.

Por fim, agradeço a menina que escolheu seguir seus sonhos a 4 anos atrás. Você ouviu muitos “nãos” e muita gente disse que você não conseguiria. Mas você conseguiu!

RESUMO

Os bisfosfonatos (BF) são drogas sintéticas indicadas para o tratamento de osteoporose, metástases ósseas, mieloma múltiplo, e Doença de Paget. Após administração são rapidamente depositadas no osso e lentamente metabolizadas. Apesar de possuir boa efetividade como agente não reabsortivo, tem como efeito colateral alto risco para danos aos ossos maxilares, causando osteonecrose da mandíbula relacionada aos bisfosfonatos. A maioria dos casos de osteonecrose ocorre subseqüentemente à cirurgia dento alveolar, como extração dental e embora o principal tecido afetado seja o osso, a liberação local de grandes quantidades de BF pode causar efeitos tóxicos para as células da mucosa oral. Além disso, há evidências de relação positiva entre doença periodontal e o desenvolvimento de osteonecrose medicamentosa. Baseando-nos em dados apresentados na literatura sobre o desenvolvimento de osteonecrose medicamentosa espontânea, e de modificações do tecido mole que possam ser causadas pelo medicamento, o objetivo deste trabalho é verificar as características do tecido conjuntivo que forma o ligamento periodontal, em ratos que foram submetidos à terapia com zoledronato endovenoso, sem a execução de procedimento cirúrgico prévio. Foram utilizados 20 ratos albinos *Wistar* machos distribuídos em 2 grupos, com 5 animais por grupo, e 2 tempos de análise: 14 dias e 28 dias: Grupo 1– Controle, animais tratados com soro fisiológico 0,9% via endovenosa (EV); Grupo 2 - tratados com ácido zoledrônico EV. Após 14 e 28 dias do início da administração do medicamento todos os animais foram submetidos à eutanásia. A mandíbula foi processada histologicamente e cortes semi-seriados foram feitos longitudinalmente ao longo eixo do alvéolo dentário do incisivo. Foram realizadas análises morfométricas e morfológicas do padrão das fibras periodontais, vascularização (nº de vasos sanguíneos), inserção das fibras em cimento e tecido ósseo alveolar, presença e quantificação de infiltrado inflamatório e largura do espaço periodontal. As análises feitas neste estudo *in vivo* sugerem que, o efeito citotóxico do ácido zoledrônico, via endovenosa, numa dose de 0,035 mg/Kg, no ligamento periodontal, pode diminuir o infiltrado inflamatório, bem como a atividade metabólica dos fibroblastos, em relação as fibras colágenas, conseqüentemente diminuindo o espaço periodontal, o que pode interferir na saúde do mesmo.

Palavras-chave: Zoledronato. Periodonto. Fibras periodontais. Fibroblastos.

ABSTRACT

Bisphosphonates (BF) are synthetic drugs indicated for the treatment of osteoporosis, bone metastases, multiple myeloma and Paget's disease. After administration are quickly deposited in the bone and slowly metabolized. Despite having good effectiveness as a reabsorptive not, have as a side effect high risk for damage to the jaw bones, causing osteonecrosis of the JAWS (BRONJ) bisphosphonate drugs-related. Most cases of BRONJ occurs subsequent to the surgery, as alveolar dental extraction dental and although the main affected tissue is bone, the local release of large quantities of BF can cause toxic effects to the cells of the oral mucosa. In addition, there is evidence of a positive relationship between periodontal disease and the development of BRONJ. Based on data presented in the literature on the development of spontaneous BRONJ, and soft tissue changes that may be caused by the medicine, the aim of this study is to verify the characteristics of connective tissue that form periodontal ligament in rats that have undergone the therapy with intravenous mg intravenously injected zoledronate, without performing surgical procedure. Albino Wistar rats will be used 20 males distributed in 2 groups with 5 animals per group, and 2 times of analysis: 14 days and 28 days: Group 1 – control, animals treated with saline 0.9% injection (EV); Group 2- treated with zoledronic acid EV. After 14 and 28 days of the beginning of the administration of medicine all animals will be eutanaized. The jaw is processed histologically and semi-seriados cuts are made along the long axis of the dental alveolus of incisor. Morphometric and morphological analyses will be carried out in the pattern of periodontal fibers, vascularization (blood vessels), insertion of fibers in cementum and alveolar bone tissue, presence and quantification of inflammatory infiltrate and width of the periodontal space. Birefringence analysis will also be held. Statistical analysis will be performed between the different treatment times within the same groups, and between different groups, at the same times of treatment. The statistical parameters evaluated will be held by non-parametric T test, followed by Welch. For the birefringence is applied the Shapiro Wilk test and the non-parametric test of Kruskal-Wallis test followed Dunn's.

Keywords: Zoledronate. Periodontium. Periodontal fibers. Fibroblasts

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Lâmina corada em HE, referente a porção coronal do ligamento periodontal de um rato do Grupo controle de 14 dias.....	10
Figura 2 - Lâmina corada em HE, referente a porção coronal do ligamento periodontal de um rato do Grupo controle de 28 dias.....	10
Figura 3- Lâmina corada em HE, referente a porção coronal do ligamento periodontal de um rato do Grupo tratado com ZL por 14 dias.....	11
Figura 4 - Lâmina corada em HE, referente a porção coronal do ligamento periodontal de um rato do Grupo tratado com ZL por 28 dias.....	11
Figura 5 – Análise da espessura do espaço do ligamento periodontal (Controle vs. Zl). * indica que $p < 0,05$	12
Figura 6 – Lâmina usadas na análise de birrefringência, referente à porção coronal do ligamento periodontal de um rato do Grupo controle de 14 dias.	13
Figura 7 – Lâmina usadas na análise de birrefringência, referente a porção coronal do ligamento periodontal de um rato do Grupo controle de 28 dias	14
Figura 8 – Lâmina usadas na análise de birrefringência, referente a porção coronal do ligamento periodontal de um rato do Grupo tratado com ZL por 14 dias.	14
Figura 9 – Lâmina usadas na análise de birrefringência, referente a porção coronal do ligamento periodontal de um rato do Grupo tratado com ZL por 28 dias.	15

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 DOENÇA PERIODONTAL E BRONJ	3
3 OBJETIVO	5
4 MATERIAIS E MÉTODOS	6
4.1 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	6
4.2 ANÁLISES MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA E HISTOMORFOMÉTRICA	7
4.3 ANÁLISE DE BIRREFRINGÊNCIA.....	7
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	8
5 RESULTADOS	9
5.1 HISTOMORFOMETRIA	9
5.2 DIMENSÕES DO LIGAMENTO PERIODONTAL.....	12
6 DISCUSSÃO	16
REFERÊNCIAS.....	19
ANEXOS	22

1 INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos (BF) são drogas sintéticas semelhantes ao pirofosfato orgânico, diferindo em sua composição química pela presença de um átomo de carbono ligado a dois grupos fosfatos (P-C-P) no lugar do oxigênio do pirofosfato (P-O-P) (DIMITRAKOPOULOUS et al., 2006). São medicamentos indicados para o tratamento de osteoporose, metástases ósseas, mieloma múltiplo, e Doença de Paget (OHLRICH et al., 2016). Após administração são rapidamente depositados no osso – de 24 a 48 horas – e lentamente metabolizados (FISHER et al., 2000).

O zoledronato é um agente não reabsortivo, caracterizado como sendo um BF associado a moléculas de nitrogênio, portanto, pertencente à classe dos BF não nitrogenados (ROELOFS et al., 2006). Bisfosfonatos nitrogenados são mais potentes que os BF não nitrogenados, pois sua grande afinidade com a hidroxiapatita aumenta sua adesão aos tecidos mineralizados (LAWSON et al., 2010).

Além do efeito antirreabsortivo, o zoledronato possui uma ação secundária na inibição do processo de mineralização (RUSSELL et al., 2008). Apesar de possuir boa efetividade como não reabsortivo, tem como efeito colateral alto risco para danos aos ossos maxilares (WOO et al., 2006).

A osteonecrose da mandíbula relacionada aos bisfosfonatos (BRONJ) é um problema sério que ocorre em um número significativo de pacientes que utilizam o BF nitrogenado como parte de seu tratamento, sendo que a maioria dos casos de BRONJ ocorre subsequentemente à cirurgia dento alveolar, como extração dental (RUGGIERO et al., 2004). A teoria da patogênese da BRONJ inclui a supressão do remodelamento ósseo, da cicatrização de tecidos moles e modificação da vascularização tecidual, promovendo efeitos antiangiogênicos (ALLEN; BURR, 2009).

Assim como o prejuízo ao tecido ósseo, a liberação local de grandes quantidades de BF pode causar efeitos tóxicos para as células da mucosa oral adjacentes ao tecido ósseo, resultando em perda do revestimento do osso, e sua consequente exposição (WALTER et al., 2010).

A homeostase da mucosa oral está diretamente relacionada com as interações que ocorrem entre o tecido epitelial e tecidos conjuntivos subjacentes. Além disso, durante a cicatrização, a expressão de fatores de crescimento por fibroblastos gengivais promove a proliferação de células epiteliais e fatores relacionados à vascularização local (WERNER et al., 2007).

Os bisfosfonatos são drogas prescritas a um grande número de pacientes, principalmente para osteoporose. Uma das consequências de sua utilização é o desenvolvimento de osteonecrose da mandíbula relacionada aos bisfosfonatos (BRONJ). Já é conhecido o fato de que procedimentos cirúrgicos bucais concomitantes à sua utilização podem desencadear o processo de osteonecrose, embora existam relatos do desenvolvimento espontâneo da BRONJ. Pouco se sabe ainda quais as consequências do acúmulo de medicamento em tecidos moles, entre eles o ligamento periodontal. Este acúmulo no ligamento periodontal pode ser o gatilho para o surgimento de casos espontâneos de osteonecrose (PIRES et al., 2018)

Assim, baseando-nos em dados apresentados na literatura sobre o desenvolvimento de BRONJ espontânea, e do relato de modificações do tecido mole que possam ser causadas pelo medicamento, objetivamos verificar as características do tecido conjuntivo que forma o ligamento periodontal, em animais que foram submetidos a terapia com zoledronato endovenoso, sem a execução de procedimento cirúrgico prévio.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇA PERIODONTAL E BRONJ

Periodontite causa perda de inserção óssea, levando a uma possível perda dental (WACTAWSKI-WENDE, 2001). Estudos mostram que a utilização de BF tem efeitos favoráveis no controle da periodontite, reduzindo a perda óssea alveolar e melhorando o índice periodontal (LANE et al., 2005).

Por outro lado, vários trabalhos indicam relação positiva entre doença periodontal e o desenvolvimento de BRONJ (AGHALOO et al., 2011; KOS, 2014; THUMBIGERE-MATH et al., 2014).

Dada à incidência de periodontite, o desenvolvimento de osteonecrose a partir da doença periodontal não pode ser subestimado. No entanto, a relação entre as alterações periodontais e a osteonecrose ainda não é compreendida (LI et al., 2016).

O ligamento periodontal (LP) é um tecido conjuntivo altamente vascularizado localizado entre a parede interna da cavidade alveolar e as raízes dos dentes, chamado de espaço periodontal. É formado por feixes de colágeno (principalmente colágeno tipo I) que ligam o cemento dos dentes à gengiva e ao osso alveolar. Os fibroblastos são as células principais do LP, que formam, mantêm e reparam o osso alveolar e o cemento (BARON et al., 2016).

O espaço periodontal é controlado durante toda a vida, mas alguns fatores podem modificá-lo, como o estresse mecânico. Os BF diminuem a largura do espaço periodontal por modular a diferenciação de células do ligamento periodontal, constituído por tecido conjuntivo fibroso altamente vascularizado (LEKIC et al., 1997).

Embora 60% dos casos de osteonecrose dos maxilares estejam associados à extração dentária, mais de 30% ocorrem espontaneamente, sem que qualquer intervenção tenha sido realizada (HOFF et al., 2008). Estudo recente mostrou que o desenvolvimento da osteonecrose pode ocorrer de forma espontânea, sem necessariamente estar relacionado à exposição óssea por procedimentos cirúrgicos prévios (QAISI et al., 2016). Hipotetizamos que os casos de osteonecrose espontânea possam estar relacionados ao acúmulo de medicamentos nos tecidos moles.

3 OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo geral analisar as características do espaço e ligamento periodontal de incisivos centrais de ratos tratados com ácido zoledrônico por via endovenosa.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara, sob protocolo nº 2015-00209, e autorizado pela Comissão de Ética em Pesquisas Animais da USC – Bauru (anexos I e II).

4.1 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 20 ratos albinos *Wistar* machos procedentes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP). Estes animais, com peso aproximado de 350g, receberam água e ração *ad libitum*, subsistindo durante todo o experimento sob em gaiolas de polipropileno, forradas com maravalha autoclavada trocada três vezes por semana, num ciclo de luz de 12 horas claro/escuro e exaustão e condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$).

A distribuição dos animais foi feita em 2 grupos com 2 tempos de análise distintos (a:14 dias e b:28 dias), sendo 4 animais por grupo, partilhados em:

- Grupo 1 - Controle, animais tratados com soro fisiológico 0,9% via endovenosa na dose de 0,035 mg/Kg a cada duas semanas, continuando até o último período experimental, segundo a quantidade de ácido zoledrônico que administrou-se no Grupo 2.
- Grupo 2 - Tratados com o ácido zoledrônico (Zometa® 4mg, Novartis Pharma Stein AG, Stein, Suíça) administrado via endovenosa na dose de 0,035 mg/Kg a cada duas semanas, de acordo com HOKUGO et al. (2010), continuando até o último período experimental.

Ao término dos 14 e 28 dias após a introdução do medicamento, todos os animais foram submetidos à eutanásia via administração parenteral de barbitúricos (Tiopental), na dose de 150mg/kg, intra-peritoneal, juntamente com lidocaína (10mg/mL). As maxilas foram removidas com auxílio de brocas tipo carburundum em baixa rotação sob refrigeração, fixadas em formalina (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 10% por 48 horas, lavadas em água corrente por 12 horas e colocadas em solução de EDTA à 4% para desmineralização das amostras, até que notou-se consistência favorável para a microtomia. Foram

feitos cortes semi-seriados longitudinais ao longo eixo do alvéolo dentário do incisivo. Os laboratórios da Universidade do Sagrado Coração foram utilizados para as análises dos espécimes.

4.2 ANÁLISES MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA E HISTOMORFOMÉTRICA

Para esta análise, os cortes referentes ao ligamento periodontal foram corados em HE (hematoxilina e eosina). Em seguida, foram obtidas imagens das regiões do espaço periodontal, capturadas com uma resolução de 300 dpi, em aumento de 200x (20x objetiva, 10x ocular), diretamente do microscópio Nikon. A contagem de células foi realizada a partir de um retângulo de 30 mm² abrangendo a região do espaço periodontal, sendo utilizada a somatória de 3 campos de cada animal, partindo do ponto mais coronal do espaço periodontal até o ponto mais apical.

Para a análise histomorfométrica, os seguintes parâmetros foram utilizados:

- contagem de leucócitos polimorfonucleares (PMN): neutrófilos;
- contagem de leucócitos mononucleares (MN): linfócitos, plasmócitos e macrófagos.
- contagem de vasos sanguíneos;
- determinação da largura do espaço periodontal

4.3 ANÁLISE DE BIRREFRINGÊNCIA

Para que as imagens referentes ao espaço periodontal (dos períodos de 14 e 28 dias) fossem capturadas sob luz polarizada, os cortes histológicos da região foram corados por solução de Picrosirius Red, obtendo imagens de 4 campos de cada amostra, no aumento de 100x (10x objetiva, 10x ocular), utilizando o laboratório de Biologia Molecular. As imagens foram tratadas através do programa Photoshop CS6, para isolar o espaço e as fibras do ligamento periodontal. A quantificação da intensidade do brilho de birrefringência foi posteriormente realizada utilizando o programa KS 300/400 com Axio Vision (versão 4.8, Carl Zeiss), sendo definidos os espectros para cor verde, amarela e vermelha, seguindo valores de RGB (Red, Green e Blue). As imagens foram

binarizadas para cada espectro de cor, e a quantidade em pixels² de cada cor correspondente à área total delimitada para região da membrana será mensurada.

Os valores das médias obtidas para cada tipo de fibra, bem como do total referente à soma de fibras verdes, amarelas e vermelhas, foram submetidos a análise estatística.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados provenientes das mensurações foram organizados em tabela em formato Excel (Microsoft Office Excel, Redmond, WA, Estados Unidos) e submetidos ao software Sigma Plot (Sigma Plot, San Jose, CA, EUA) versão 13.0 e analisados em relação à distribuição normal (teste Shapiro-Wilk e igualdade de variância) e, posteriormente, foi adotado o teste de t (dois grupos: espessura do LP), quando houve distribuição normal e teste de Mann-Whitney, quando não houve distribuição normal. Quando houve análise em dois fatores (Tipo celular e grupos; Tipo celular e tempo; Tipo de fibra e grupos; Tipo de fibra e tempo) executou-se uma análise de variância a dois fatores. O pós-teste aplicado foi o de Tukey Adotou-se um nível de significância de 5% para as análises.

5 RESULTADOS

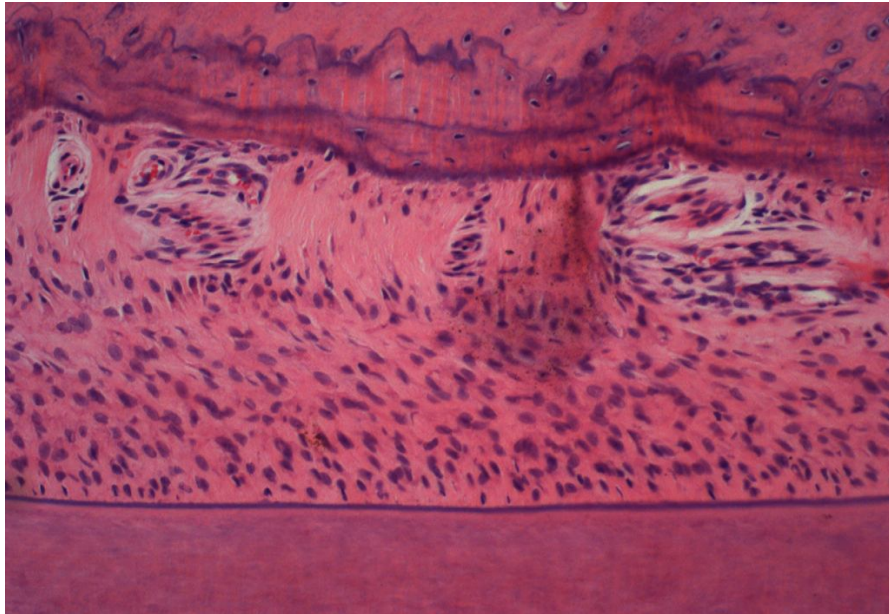
5.1 HISTOMORFOMETRIA

Em uma análise comparando os grupos ZL vs. Controle no período de 14 dias foi identificado uma diferença significativa na comparação dos grupos, $p < 0,001$, sendo que o pós-teste indicou diferença significativa na comparação de leucócitos monucleares para o grupo controle (média:16,8) vs. grupo ZI (média:7), $p < 0,001$. Entretanto, nas comparações para vasos sanguíneos ($p = 0,461$) e leucócitos polimorfonucleares ($p = 0,267$) não foi identificado diferença significativa na comparação dos grupos.

Em uma análise considerando 28 dias, semelhantemente aos dados apresentados para 14 dias, foi identificado uma diferença significativa na comparação entre os grupos ($p < 0,001$), sendo que esta diferença foi expressiva para leucócitos monucleares ($p < 0,001$) na comparação dos grupos, não sendo identificado diferença significativa ao comparar os grupos vasos sanguíneos ($p=0,394$), leucócitos polimorfonucleares ($p = 0,608$).

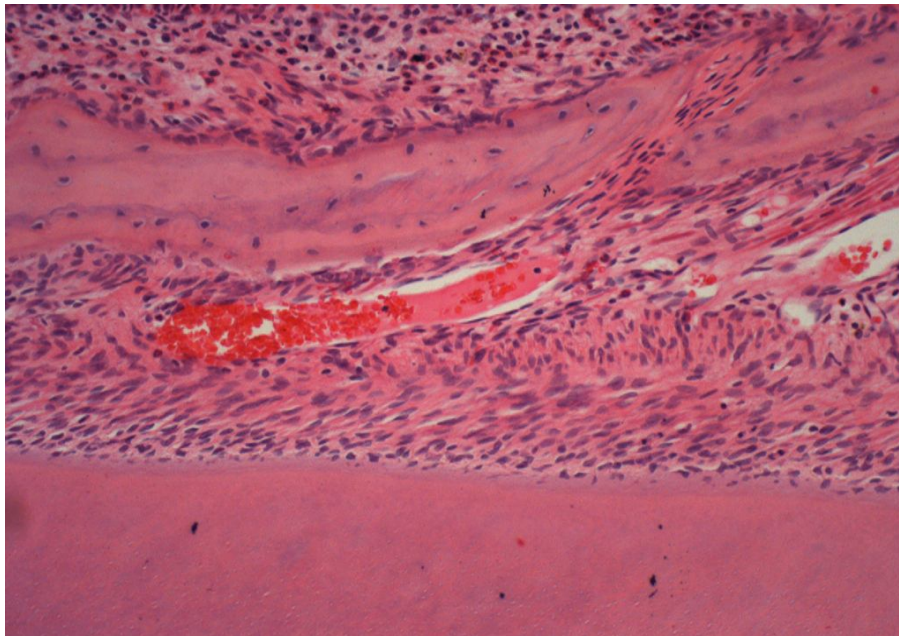
Em uma análise específica do grupo ZL, na comparação dos períodos de tempo 14 e 28 dias, não foi identificado uma diferença significativa para os períodos comparados ($p = 0,134$) e inclusive para vasos sanguíneos ($p = 0,371$), leucócitos monucleares ($p = 0,055$) e leucócitos polimorfonucleares ($p = 0,826$).

Figura 1 - Fotomicrografia corada com HE, referente a porção coronal do ligamento periodontal de um rato do Grupo controle de 14 dias.



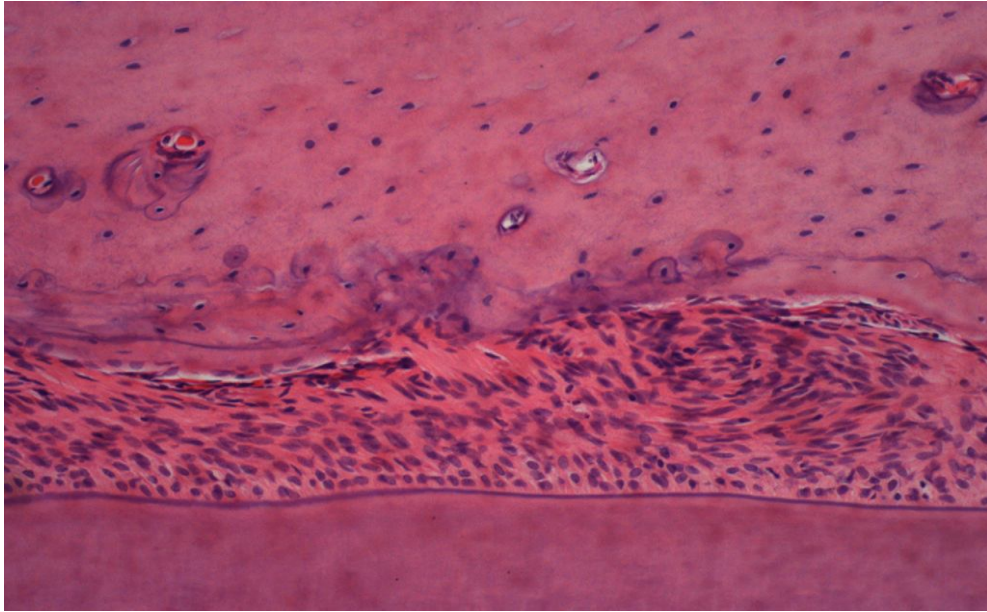
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 2 - Fotomicrografia corada com HE, referente a porção coronal do ligamento periodontal de um rato do Grupo controle de 28 dias.



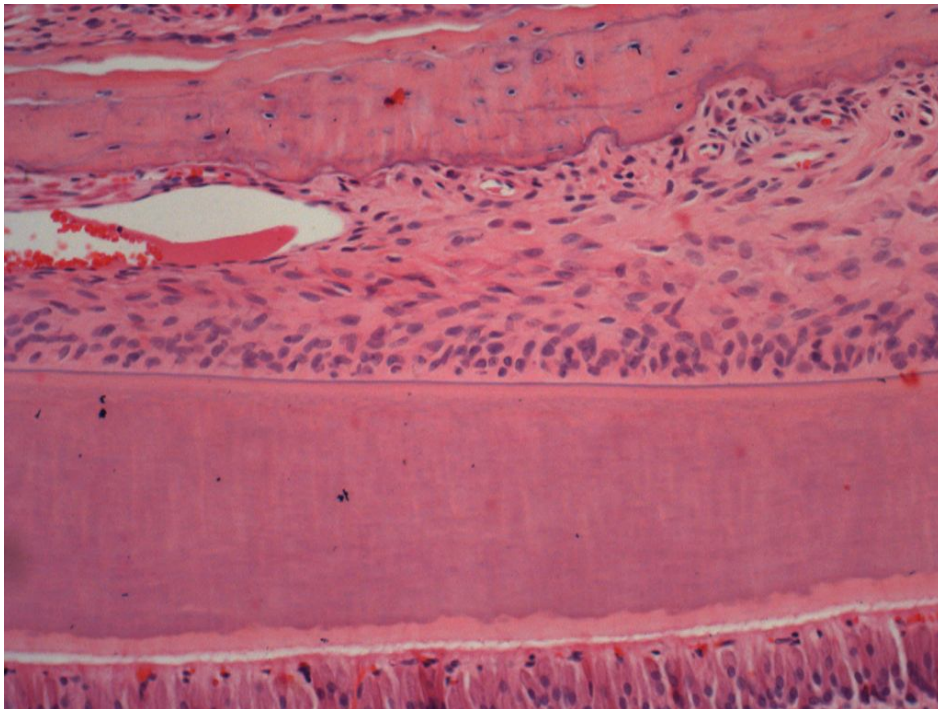
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3– Fotomicrografia corada com HE, referente a porção coronal do ligamento periodontal de um rato do Grupo tratado com ZL por 14 dias.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4 - Fotomicrografia corada com HE, referente a porção coronal do ligamento periodontal de um rato do Grupo tratado com ZL por 28 dias.

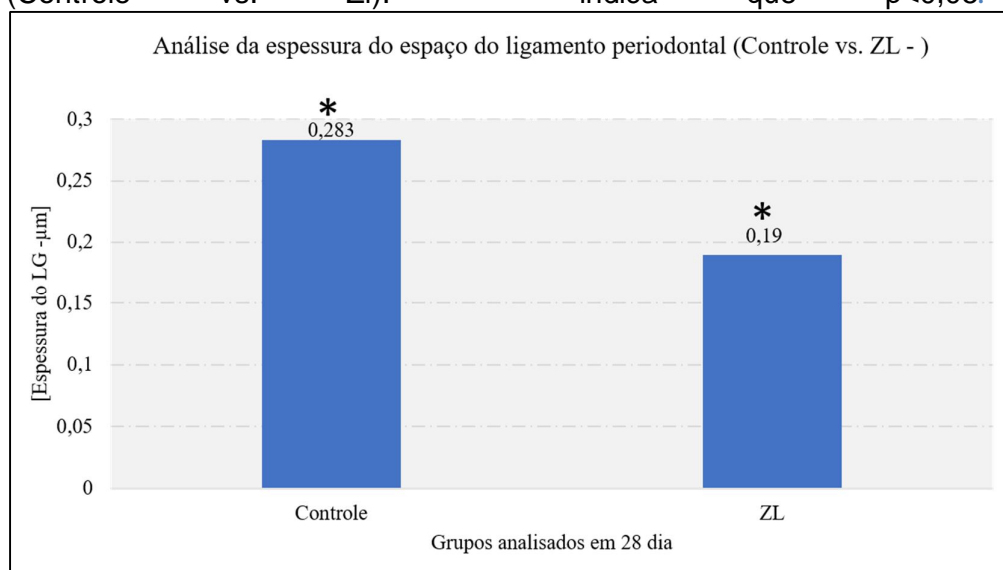


Fonte: Elaborado pelo autor

5.2 DIMENSÕES DO LIGAMENTO PERIODONTAL

Em uma análise da espessura do ligamento periodontal para o grupo controle (média:0,217) e ZI. (média: 0,181) considerando 14 dias, foi identificado que não houve diferenças significativas nesta comparação, $p=0,144$. Todavia, em uma análise de 28 dias, houve uma diferença significativa na comparação dos grupos controle (med: 0,283) vs. ZI (med:0,190), $p\leq 0,001$, conforme pode ser verificado na figura 5.

Figura 5 – Análise da espessura do espaço do ligamento periodontal (Controle vs. ZI). * indica que $p<0,05$.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em uma análise específica do grupo ZI para 14 dias (media: 0,181) vs. 28 dias (média:0,186), não foi identificado diferenças significativas nestes grupos, $p=0,731$.

4.3 BIRREFRINGÊNCIA

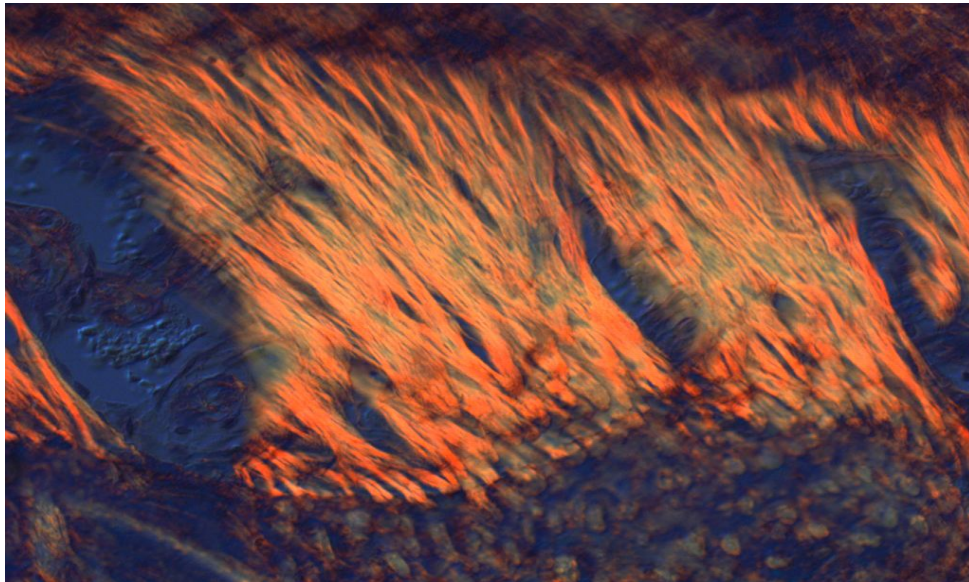
Em uma análise do tipo de fibras para cada grupo considerado, foi observado na comparação dos grupos controle vs. ZI no período de 14 dias que há uma diferença significativa entre os grupos ($p=0,040$) e que isto ocorre para fibras finas na comparação do grupo controle vs. ZI ($p=0,016$), entretanto

não foi identificada uma diferença significativa na comparação das fibras médias ($p = 0,678$), fibras grossas ($p = 0,469$) para os dois grupos analisados.

Ao considerar 28 dias, não foi identificada diferenças significativas para os tipos de fibras analisados: fina ($p = 0,815$); média ($p=0,599$), grossas ($p=0,450$).

Em uma análise considerando especificamente o grupo ZI ao comparar-se os períodos de tempo 14 vs. 28 dias, há uma diferença significativa entre os períodos analisados ($p = 0,004$) e esta diferença é observada no grupo de fibras finas ($p = 0,006$), entretanto não foi identificada uma diferença significativa para a comparação de fibras médias ($p = 0,504$) e fibras grossas ($p = 0,104$).

Figura 6 – Fotomicrografia usada na análise de birrefringência, referente à porção coronal do ligamento periodontal de um rato do Grupo controle de 14 dias.



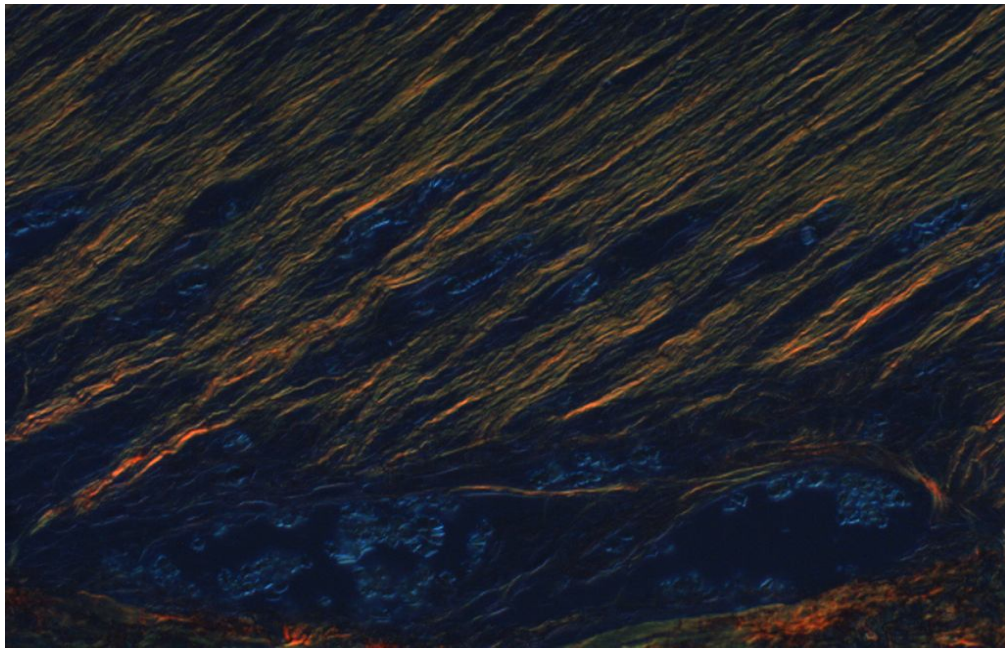
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 – Fotomicrografia usada na análise de birrefringência, referente a porção coronal do ligamento periodontal de um rato do Grupo controle de 28 dias



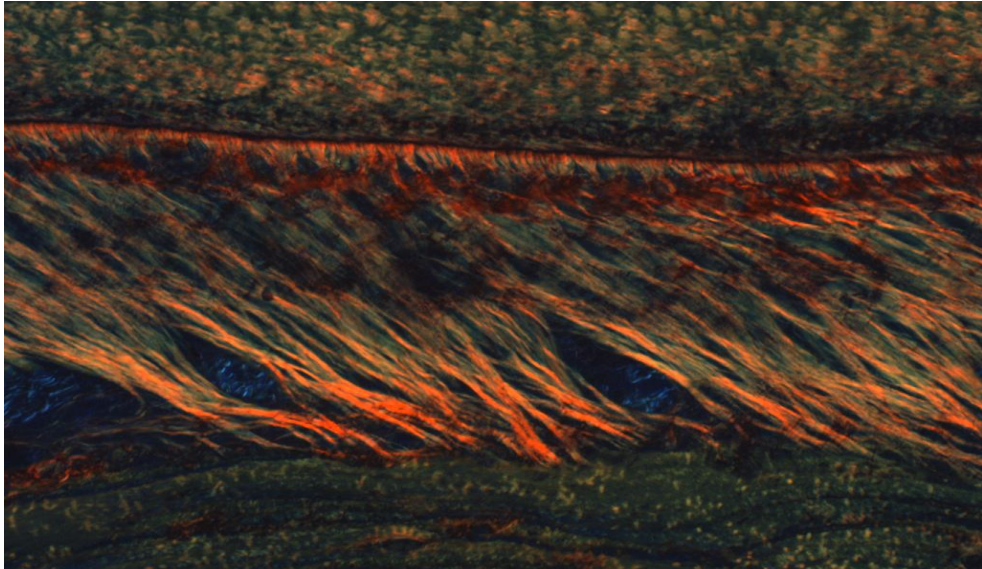
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8 – Fotomicrografia usadas na análise de birrefringência, referente a porção coronal do ligamento periodontal de um rato do Grupo tratado com ZL por 14 dias.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9 – Fotomicrografia usadas na análise de birrefringência, referente a porção coronal do ligamento periodontal de um rato do Grupo tratado com ZL por 28 dias.



Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

É possível verificar o metabolismo dos fibroblastos através de algumas características morfológicas encontradas no tecido, como a espessura do espaço do ligamento periodontal e a quantidade de fibras colágenas (CORREIA et al., 2006; BASSO et al., 2013). Nesta pesquisa, foi possível observar que houve uma diminuição nesses dois aspectos, o que pode indicar uma queda no metabolismo dessas células com ênfase nas fibras finas, e se intensificou com o maior tempo de uso da medicação.

Semelhantemente, o estudo de Açil et al, onde apontou que os bisfosfonatos diminuíram a proliferação das células fibroblástica, na mesma proporção que diminuíram produção de colágeno, sendo o zolendronato (ZL) o BF com mais potencia de inibição dos bisfosfonatos testados.

Além disso, em estudos prévios indicaram que as alterações na largura do espaço periodontal e qualidade das fibras colágenas, além de serem observadas desde os períodos iniciais do tratamento, como neste estudo, persistiram pelo período de 9 semanas após a descontinuação do tratamento (OKAMOTO et al., 2013). Isso condiz com os achados dessa pesquisa, que indicou diminuição significativa estatisticamente em relação à espessura do espaço do ligamento periodontal ao longo prazo do uso do medicamento.

Por fim, estudos realizados por Ferretti et al (2005) apontaram que os BF nitrogenados podem também podem inibir a angiogênese. Segundo Wood et al (2002), o ZL mostrou inibição da proliferação de células que formam a parede dos vasos sanguíneos (células endoteliais), interferindo na sua adesão e migração. Estas informações podem ser uma explicação para diminuição dos leucócitos mononucleares apontados nessa pesquisa, tanto no grupo de 14 semanas, como também no grupo de 28 semanas.

Entretanto, um estudo realizado por Ohlrich et al (2016) mostrou que, apesar da supressão do infiltrado inflamatório e diminuição do calibre dos vasos sanguíneos, os fibroblastos responderam ao ácido zoledrônico

produzindo significativa quantidade genes proangiogênicos, e, segundo os autores, seria uma provável reação contra uma mediação antiangiogênica causada pelo próprio ZL, para a manutenção da homeostasia.

7 CONCLUSÃO

As análises feitas neste estudo *in vivo* sugerem que, o efeito citotóxico do ácido zoledrônico, via endovenosa, numa dose de 0,035 mg/Kg, no ligamento periodontal, diminuiu o infiltrado inflamatório, bem como a atividade metabólica dos fibroblastos, em relação às fibras colágenas, conseqüentemente diminuindo o espaço periodontal, o que pode interferir na saúde do mesmo.

REFERÊNCIAS

- AÇIL, Y. et al. **The cytotoxic effects of three different bisphosphonates in-vitro on human gingival fibroblasts, osteoblasts and osteogenic sarcoma cells.** Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, v. 40, p. 229-235, 2012.
- AGHALOO, T.L. et al. **Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat.** J Bone Miner Res., v. 26, p. 1871-1882, 2011.
- AGIS, H. et al. **Is zoledronate toxic to human periodontal fibroblasts?** J Dent Res, v. 89, p. 40-45, 2010.
- ALLEN, M.R.; BURR, D.B. **The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data.** Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, v. 67, p. 61–70, 2009.
- BARON, M. et al. **Relationship between disease characteristics and oral radiologic findings in systemic sclerosis: results from a Canadian oral health study.** Arthritis Care Res (Hoboken), v. 68, p. 673–680, 2016.
- BASSO, F. et al. **Cytotoxic effects of zoledronic acid on human epithelial cells and gingival fibroblasts.** Braz Dent J. v.24, p.551–8, 2013.
- BASSO, F. et al. **Response of a co-culture model of epithelial cells and gingival fibroblasts to zoledronic acid.** Braz. oral res., São Paulo , v. 30, n. 1, e122, 2016 .
- CHEONG, S. et al. **Bisphosphonate Uptake in Areas of Tooth Extraction or Periapical Disease.** Journal of Oral and Maxillofacial Surgery , v. 72, p. 2461 – 2468, 2014.
- CORREIA, V.F.P.; CALDEIRA, C.L.; MARQUES, M.M. **Cytotoxicity evaluation of sodium alendronate of cultured human periodontal ligament fibroblasts.** Dent Traumatol, v. 22, p. 312, 2006.
- DIMITRAKOPOULOS, I.; MAGOPOULOS, C.; KARAKASIS, D. **Bisphosphonate-induced avascular osteonecrosis of the jaws: a clinical report of 11 cases.** Int J Oral Maxillofac Surg., v. 35, p. 588-593, 2006.
- FERRETTI, G. et al. **Zoledronic-acid-induced circulating level modifications of angiogenic factors, metalloproteinases and proinflammatory cytokines in metastatic breast câncer patients.** Oncology, v. 69, p. 35–43, 2005.
- FISHER, J.E.; RODAN, G.A.; RESZKA, A.A. **In vivo effects of bisphosphonates on the osteoclast mevalonate pathway.** Endocrinology, v. 141, p. 4793-4796, 2000.

HOFF, A.O. et al. **Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates.** Journal of bone and mineral research, v. 23, p. 826–836, 2008.

HOKUGO, A. et al. **Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with vitamin D deficiency in rats.** J Bone Miner Res., v. 25, p. 1337-1349, 2010.

KOMATSU, Y. et al. **Zoledronic acid suppresses transforming growth factor- β -induced fibrogenesis by human gingival fibroblasts.** International Journal of Molecular Medicine, v. 38, p.139-147, 2016.

KOS M. **Association of dental and periodontal status with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. A retrospective case controlled study.** Archives of Medical Science, v. 10, p. 117-123, 2014.

LANE, N. et al. **Bisphosphonate therapy improves the outcome of conventional periodontal treatment: results of a 12-month, randomized, placebo-controlled study.** Journal of Periodontology, v. 76, p. 1113–1122, 2005.

LAWSON, M.A. et al. **Differences between bisphosphonates in binding affinities for hydroxyapatite.** J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater, v. 92, p. 149-155, 2010.

LEKIC, P. et al. **Bisphosphonate modulates proliferation and differentiation of rat periodontal ligament cells during wound healing.** Anat Rec., v. 247, p. 329–340, 1997.

LI, C.L. et al. **Role of periodontal disease in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in ovariectomized rats.** Clin. Oral Impl. Res., v. 27, p. 1–6, 2016.

MCLEOD, N. et al. **In Vitro Effect of Bisphosphonates on Oral Keratinocytes and Fibroblasts.** Journal of Oral and Maxillofacial Surgery , v. 72, p.503 – 509, 2013.

NICOLATOU-GALLITIS, O. et al. **Periodontal disease preceding osteonecrosis of the jaw (ONJ) in cancer patients receiving antiresorptives alone or combined with targeted therapies: report of 5 cases and literature review.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol V. 120; p. 699-706, 2015.

OHLRICH, E.J. et al. **The bisphosphonate zoledronic acid regulates key angiogenesis-related genes in primary human gingival fibroblasts.** Archives of Oral Biology, v. 63, p. 7–14, 2016.

OKAMOTO, Y. et al. **High-dose zoledronic acid narrows the periodontal space in rats.** Int. J. Oral Maxillofac. Surg; v. 42, p. 627–631, 2013.

QAISI, M. et al. **Denosumab Related Osteonecrosis of the Jaw with Spontaneous Necrosis of the Soft Palate: Report of a Life Threatening Case.** Case Reports in Dentistry, v. 2016, Article ID 5070187, 2016.

ROELOFS, A.J. et al. **Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status.** Clinical Cancer Research, v. 12, p. 6222s–30s, 2006.

RUGGIERO, S.L. et al. **Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases.** Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, v. 62, p. 527–534, 2004.

SHEPER, M. et al. **Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis.** British Journal of Haematology, v. 144, p. 667–676, 2009

TANAKA, Y. et al. **In vitro cytotoxicity of zoledronate (nitrogen-containing bisphosphonate: NBP) and/or etidronate (non-NBP) in tumour cells and periodontal cells,** Archives of Oral Biology, v. 58, p. 628-637, 2013.

THUMBIGERE-MATH, V. et al. **Periodontal disease as a risk factor for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw.** J Periodontol., v.85, p.226-233, 2014.

WACTAWSKI-WENDE, J. **Periodontal diseases and osteoporosis: association and mechanisms.** Annals of Periodontology/The American Academy of Periodontology, v. 6, p. 197–208, 2001.

WALTER, C. et al. **Influence of bisphosphonates on endothelial cells, fibroblasts, and osteogenic cells.** Clin Oral Investig; v.14, p.35-41, 2010.

WERNER, S.; KRIEG, T.; SMOLA, H. **Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing.** J Invest Dermatol; v.127, p. 998-1008, 2007.

WOOD, J. et al. **Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid.** J Pharmacol Exp Therap, v. 302, p. 1055, 2002.

YOO, J. et al. **Could zoledronic acid prevent root resorption in replanted rat molar?.** Dent Traumatol, v. 31, p. 465–470, 2015.

ANEXOS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
 FACULDADE DE ODONTOLOGIA
 FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

CERTIFICADO

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

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Março de 2017.

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

CERTIFICATE

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

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 01, 2017.

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


Profa. Dra. Maria Gisela Laranjeira
 Coordenadora da CEUA
 CEUA Coordinator

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



**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA - USC**

CARTA DE DISPENSA

A CEUA USC dentro de suas competências e seguindo normas vigentes no Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal – CONCEA, analisou a solicitação de dispensa de parecer para o projeto **"MODIFICAÇÕES NO TECIDO PERIODONTAL DE RATOS TRATADOS CRONICAMENTE COM BIOFOSFATO NITROGENADO ENDOVENOSO"**, sob a responsabilidade da pesquisadora **Dr.^a Patrícia Pinto Saraiva** e considerou a solicitação **APROVADA** por tratar-se de uma análise feita a partir de lâminas histológicas já confeccionadas.

Bauru, 30 de janeiro de 2017.

Dra. Dulce H. J. Constantino
Presidente CEUA – USC