



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MARIA ELISA QUEZADO LIMA VERDE

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO
NOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E MORFOESTRUTURAIS
DO TECIDO OSSEODENTÁRIO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS
A MODELO DE OSTEONECROSE DOS MAXILARES.

FORTALEZA

2019

MARIA ELISA QUEZADO LIMA VERDE

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO
NOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E MORFOESTRUTURAIIS
DO TECIDO OSSEODENTÁRIO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS
A MODELO DE OSTEONECROSE DOS MAXILARES.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.
Área de Concentração: Clínica Odontológica

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Negreiros
Nunes Alves

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L699a Lima Verde, Maria Elisa Quezado.
Análise da influência do ácido zoledrônico nos parâmetros físico-químicos e morfoestruturais do tecido osseodentário de camundongos submetidos a modelo de osteonecrose dos maxilares. / Maria Elisa Quezado Lima Verde. – 2019.
65 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves.
1. Bisfosfonatos. 2. Qualidade óssea. 3. Arcada osseodentária. 4. Dente. 5. Fraturas femorais. I. Título.
CDD 617.6
-

MARIA ELISA QUEZADO LIMA VERDE

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO
NOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E MORFOESTRUTURAIS
DO TECIDO OSSEODENTÁRIO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS
A MODELO DE OSTEONECROSE DOS MAXILARES.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.
Área de Concentração: Clínica Odontológica

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Negreiros
Nunes Alves

Aprovada em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Ramilye Araújo Lima
Centro Universitário Christus - Unichristus

Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão
Universidade Federal do Ceará

Dedico este trabalho a Deus, por ser o verdadeiro autor de tudo.

Aos meus pais, Alexei e Sandra, que são o meu porto seguro e fortaleza.

Ao meu saudoso e amado tio, Marcus Aurélio, que está sempre comigo.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal do Ceará (UFC)**, instituição que é seio da minha formação profissional, a qual tive o prazer de retornar após ~~a conclusão da~~ minha graduação em Odontologia, na pessoa do magnífico reitor, prof. Henry de Holanda Campos.

À **Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da UFC**, na pessoa de sua diretora, profa. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará**, na pessoa do coordenador, prof. Vicente de Paulo Aragão Saboia. Tenho uma grande honra em ser aluna de Mestrado do PPGO, que também possibilitou a execução desta pesquisa. Agradeço aos seus professores e funcionários, que tanto contribuíram para o meu crescimento profissional durante este período.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de estudos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, pois sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais, **Alexei Rabelo Lima Verde** e **Sandra Orlene Quezado Lima Verde**, meus exemplos, meu tesouro e porto seguro. Cada um, com seu jeito especial, ajudou a formar minha personalidade e a sedimentar virtudes que sempre levarei comigo. Grata por todo o apoio, educação e amor dedicados a mim desde sempre. Vocês são o grande alicerce da minha vida, a maior e mais concreta manifestação do amor incondicional de Deus em mim.

Aos meus irmãos e melhores amigos, **Francisco Tarcísio Guedes Lima Verde Neto (Maninho)** e **Maria Clara Quezado Lima Verde**, pelo amor, paciência, companheirismo e compreensão. Frente a tantos momentos de fragilidade e estresse, vocês foram a fortaleza necessária pra que eu continuasse sempre em frente. Além disso, agradeço ao Maninho pela ajuda e paciência na execução e análise dos testes de flexão de três pontos. Sem ele eu não teria conseguido.

À minha avó materna, **Agripina Cavalcante Janja (Mainha)**, a alegria do nosso cotidiano, por ser única e indispensável com esse jeito amoroso, divertido e com suas incansáveis preces. Santa Rita, das causas impossíveis, certamente intercedeu bastante.

Ao meu amado tio **Marcus Aurélio Rabelo Lima Verde** (*in memoriam*), minha eterna saudade, exemplo, referencial e incentivo. Deus preferiu tê-lo no céu, como nosso grande intercessor. A emoção vem à tona todas as vezes que imagino que ele estaria ao meu lado, fazendo-se presente principalmente nessa reta final, alegrando-se e orgulhando-se de cada uma das minhas conquistas. Mas, neste mundo, ficam conosco as lembranças da pessoa e do profissional que foi, bem como a certeza de termos um anjo da guarda, e a convicção de que nada, nenhum momento, presente ou futuro... nem mesmo a melhor bossa nova é a mesma sem você aqui, tio.

A toda a minha família, pelo testemunho constante de fé, fortaleza e união. Por torcerem e acreditarem em mim. Em especial, aos meus tios padrinhos, **Humberto Alves Quezado Júnior** e **Ana Patrícia Janja Quezado**, exemplos de humanidade e bom coração, pelo amor de uma vida inteira. À minha avó paterna, **Zaida Madeira Barros Lima Verde** (Iabó), por vibrar, comemorar e torcer por cada conquista minha, mesmo de longe. À minha tia, **Olívia Morais de Lima Mota**, pelo exemplo de mulher, de fortaleza, de mãe e de dentista, e às minhas primas, **Marina Mota Lima Verde**, **Raquel Crisóstomo Lima Verde**, **Emílio**

Crisóstomo Lima Verde, Paula Crisóstomo Lima Verde e Neide Crisóstomo Lima Verde, pela amizade desde a infância.

À minha querida professora **Ana Paula Negreiros Nunes Alves**, minha eterna orientadora, pela incomparável educação ao longo desses anos. Por me incentivar a superar qualquer dificuldade ou desafio, sendo, além de uma grande professora com jeitinho de mãe, uma amiga que cada vez mais admiro. Por ser, enfim, exemplo de muito do que eu desejo ser. Obrigada por estar ao meu lado em situações tão importantes e marcantes da minha vida... por sempre me encorajar a alçar voos cada vez mais altos. Que Deus me permita tê-la sempre por perto, vivendo grandes momentos e almejando sonhos cada vez maiores juntas. Qualquer crescimento meu, em nível pessoal ou profissional, direta ou indiretamente, leva o seu nome.

Ao meu querido professor **Mário Rogério Lima Mota**, pelo exemplo de humanidade, didática e intelectualidade. Seu jeito amoroso e imenso brilhantismo sempre me fizeram admirá-lo cada dia mais, e me inspiram a buscar ser o melhor de mim. Tenho no senhor, além de um extraordinário professor, um grande amigo. Obrigada pelos incentivos e motivações diárias.

Ao meu querido professor **Fabrcio Bitu Sousa**, pela sua fortaleza. Sou grata por cada oportunidade e incentivo... por acreditar em mim até mesmo quando eu não acreditei. Obrigada pelo seu jeito amoroso, inteligente, protetor e agregador, e pelo exemplo de humanidade e profissionalismo. Obrigada também pelo carinho e amizade sedimentados ao longo desses anos.

Aos integrantes do **Laboratório de Patologia Bucodental**, em especial aos amigos **Paulo Goberlânio de Barros Silva** (Paulinho), **Antônio Ernando Carlos Ferreira Júnior** e **Camila Carvalho de Oliveira**, amigos que convivo desde que entrei na iniciação científica, e cuja companhia faz qualquer serviço ou aprendizado ficar mais leve, divertido e empolgante. Obrigada por, desde muito tempo atrás, dividirem comigo momentos de descontração e por ajudarem a mostrar a importância da união e do trabalho em equipe.

Aos alunos da iniciação científica, pela indescritível ajuda durante os experimentos e análises. Vocês são a base de qualquer laboratório! Obrigada pela parceria, disponibilidade e dedicação de sempre! Em especial, aos alunos **Maria Imaculada de Queiroz Rodrigues**, **Manuela da Silva Moreira**, **Mariana Dantas do Nascimento** e **Francisco Dênis Araújo da Silva**, que incessante e incansavelmente se prontificaram durante os experimentos deste e de outros estudos em paralelo, mesmo em feriados e recessos. Tudo isso foi possível graças à ajuda

de vocês! É maravilhoso poder contribuir de alguma forma com o crescimento de vocês. Mas com certeza o meu aprendizado com a nossa convivência é infinitamente maior.

À amiga **Carolina Rodrigues Teófilo**, que desde a minha iniciação científica me ensina tanto, como profissional e como pessoa íntegra, humana e resiliente que sempre foi... por ser dona de um coração maior que você mesma. Obrigada pela nossa amizade, Cacá.

Aos demais amigos da pós-graduação (tanto os que ainda estão na minha convivência quanto os que já concluíram a pós) pelos bons momentos de aprendizado e diversão compartilhados durante esse tempo. Obrigada por toda a paciência, carinho e solidariedade, mesmo frente aos meus momentos de inquietação e desespero. Destaco, entre os quais, **Malena Regina de Freitas e Silva, Clarissa Pessoa Fernandes Forte, Thâmara Manoela Marinho Bezerra, José Ronildo Lins do Carmo Filho, João Eudes Teixeira Pinheiro Filho, Sthefane Gomes Feitosa, Thales Salles Angelim Viana, Breno Souza Benevides, Karine Cestaro Mesquita, Thinali Sousa Dantas, Isabelly Vidal do Nascimento, Talita Arrais Daniel Mendes, Vilana Maria Adriano Araújo, Francisco Samuel Rodrigues de Carvalho, Diana Araújo Cunha**, e aos colegas da turma de mestrado, **Iana Sá de Oliveira, Tayara Marques, Amanda Mourão Ley e Breno Cavalcante Martins**.

Aos demais **professores do curso de Odontologia da UFC**. Cada um, em sua particularidade, se fez exemplo e contribuiu para o meu progresso acadêmico. Sem dúvidas, fizeram a diferença durante a minha graduação e por isso guardo seus ensinamentos até então.

Aos colegas de graduação da **turma 2016.2**, pela união e harmonia constantes na nossa convivência enquanto acadêmicos. Obrigada pelo caminho que trilhamos juntos.

Às amigas e irmãs de alma, **Gisele Crisóstomo de Quental, Lorena de Fátima Vitor de Moura e Carolina Girão Oliveira Abdala**, pela amizade sedimentada durante a graduação e depois dela. Certamente levaremos para a vida inteira. Obrigada pelo ombro amigo, pela empatia constante e por tornarem a minha vida mais leve e feliz! Amo vocês!

Ao **Núcleo de Estudos em Pacientes Especiais (NEPE)**, por, desde a graduação, semear em mim a visão do quão especial todo paciente é. Por todas as lições científicas e humanas. Tenho muito orgulho em até hoje fazer parte deste projeto de extensão. Agradeço, em especial, aos integrantes **Nayra Cecília Santos Campelo, Yana Maria Bezerra Farias, Bliss Muwata Ilanda, Diana Larissa Leitão Botelho e Rafael Silva Gomes**, seja pela proatividade e dedicação durante o serviço de ambulatório das sextas-feiras ou pela confiança sempre em mim depositada para contribuir de alguma forma com suas atividades científicas.

A todos os funcionários da UFC, cujo trabalho é tão indispensável quanto o de todos os outros. Especialmente, ao **Rui Lino**, **Sônia Loiola** (Soninha) (*in memoriam*), **Maria Luiza** (Malu), **Marta Praciano** (Martinha). Também aos técnicos de laboratório **Alceu Machado** e **David Queiroz**, pela ajuda e ensinamentos nas etapas laboratoriais, cada um em sua expertise.

Ao **Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos** (NPDM), pela estrutura de excelência com a qual pude contar durante todo o período do experimento *in vivo*.

À **Central Analítica-UFC/CT-INFRA/MCTI-SISNANO/Pró-Equipamentos CAPES**, pelo apoio e estrutura para realização de parte das análises deste estudo. Em especial, aos **profs. Emílio de Castro Miguel** e **Alexandre Rocha Paschoal**, aos pós-graduandos **Sergimar Kennedy de Paiva Pinheiro** e **Enzo Victoriano Hernandez Agressot**, e aos técnicos **João Victor Serra Nunes** e **Marlos de Medeiros Chaves**, pela ajuda com as análises e pelo aprendizado durante todo esse tempo de idas e vindas ao campus do Pici.

Aos professores que aceitaram compor as bancas de qualificação e pré defesa deste trabalho, **prof. Fábio Wildson Gurgel Costa**, **profa. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage** e **prof. Victor Pinheiro Feitosa**, bem como às professoras integrantes da banca de defesa, **profa. Ramille Araújo Lima** e **profa. Renata Ferreira de Carvalho Leitão**, pelas contribuições e lapidações deste estudo, enriquecendo-o para a futura publicação do *paper*.

Ao **serviço de Radiologia da Universidade Federal da Paraíba**, na pessoa do prof. Frederico Barbosa de Sousa e do pós-graduando Basílio Rodrigues Vieira, pela parceria estabelecida na execução das microtomografias computadorizadas.

Ao **Centro Universitário Christus**, sobretudo ao curso de Odontologia, seus professores, funcionários e alunos. A Unichristus foi o meu melhor presente de 2017. Fazer parte dessa equipe é uma experiência engrandecedora, um incentivo constante em busca dos meus objetivos enquanto docente. Sei que ainda tenho muito a aprender (na verdade, sempre terei), mas aprender em um lugar assim faz toda a diferença. Sou muito feliz por fazer parte disso tudo. Em especial, agradeço à equipe da coordenação pedagógica, **profa. Renata Mota Rodrigues Bitu**, **profa. Clarissa Pessoa Fernandes Forte**, **profa. Juliana Ximenes Damasceno**, **prof. Abrahão Cavalcante Gomes de Souza Carvalho** e **profa. Thinali Sousa Dantas**, pela compreensão, apoio e pelas palavras de incentivo e credibilidade nas vezes em que foi mais difícil conciliar o trabalho e a pós-graduação.

À amiga **Clarissa Pessoa Fernandes Forte**, que conheço desde que eu era da iniciação científica, mas só depois que viramos colegas de trabalho pude ter noção do quanto

ela é incrível! Obrigada por todos os ensinamentos, pelo carinho, por me fazer tão bem e tornar meus dias mais leves. Enfim, por ser essa pessoa na qual me espelho tanto! Sou sua fã!

À amiga **Juliana Ximenes Damasceno**, que divide praticamente tudo comigo, do trabalho e da vida. Obrigada por ser tão presente, com sua empatia, confiança, cumplicidade e amizade sincera. Estar ao seu lado torna qualquer dia mais alegre, e contar com você foi imprescindível durante esse período. Nutro um amor e admiração enormes pela pessoa que você é, Juju, e agradeço a Deus por permitir o encontro das nossas vidas. Você é alguém que me faz ser melhor e mais feliz a cada dia, e é por isso que eu quero ter você sempre por perto!

À amiga **Ramille Araújo Lima**, que tanto admiro... um dos exemplos de inteligência, dedicação e uma das minhas inspirações como jovem pesquisadora. Obrigada pela amizade e constante troca de experiências e ideias!

Aos demais amigos que, com sua companhia e amizade, foram responsáveis por tornar esta caminhada mais leve.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que tudo isso fosse possível.

“The most beautiful experience we can have is the mysterious. It is the fundamental emotion that stands at the cradle of true art and true science.”

Albert Einstein

RESUMO

O ácido zoledrônico (AZ) é incorporado ao osso através de sua afinidade por cristais de hidroxiapatita, podendo provocar alterações estruturais e físico-químicas em tecidos mineralizados. Objetivou-se analisar as propriedades físico-químicas e morfoestruturais do tecido osseodentário de camundongos submetidos a modelo de osteonecrose dos maxilares (OM) relacionada ao uso crônico de AZ. Trata-se de um estudo experimental, *ex vivo*, de delineamento fatorial 2x2, cujos fatores possuíam dois níveis: macho e fêmea (sexo) e AZ e Salina (tratamento). O estudo contou com oito animais por grupo e foi realizado em duplicata. Após três administrações semanais (dias 0, 7, 14) de AZ 1,0 mg/kg ou solução salina, realizou-se a exodontia do 2º molar inferior esquerdo (dia 42). Uma administração adicional foi realizada (dia 49) e, posteriormente, a eutanásia (dia 70). Amostras foram analisadas por espectroscopia Raman, microscopia óptica convencional (análise histológica e histomorfométrica), flexão de três pontos e microtomografia computadorizada. Dados quantitativos (média±EPM) foram comparados utilizando ANOVA 2-way/Bonferroni (sexo e tratamento), ou ANOVA one-way (tempo) e 2-way (sexo e tratamento) para medidas repetidas/Bonferroni, considerando, para todas as análises, $p < 0,05$. A massa corpórea dos animais, apesar de aumentar de forma significativa com o tempo, não foi influenciada pelos fatores sexo ($p = 0,216$) e tratamento ($p = 0,544$). O tratamento com AZ promoveu alterações histológicas na estrutura epifisária femoral, e em sítios de exodontia, aumentou o percentual de lacunas de osteócitos vazias e de osteoclastos apoptóticos, do número de células inflamatórias totais e polimorfonucleares ($p < 0,05$). Além disso, animais tratados com AZ apresentaram, de forma significativa, um menor número e maior separação das trabéculas ósseas, bem como uma menor razão entre volume ósseo e volume tecidual em osso trabecular alveolar. As fêmeas (AZ e salina) apresentaram um valor significativamente inferior deste último parâmetro. No que tange às propriedades mecânicas do osso femoral, os fatores sexo e tratamento exerceram influência de forma independente, respectivamente, nos parâmetros de área de secção transversal ($p < 0,001$ e $p = 0,001$), carga máxima ($p < 0,001$ e $p < 0,001$), momento de inércia ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) e trabalho total à fratura ($p < 0,001$ e $p = 0,030$), sendo inferiores nas fêmeas e aumentados nos animais tratados (AZ), que também apresentaram uma maior rigidez à flexão. Os parâmetros de tensão de escoamento e o módulo de flexão, respectivamente, mostraram-se superiores nas fêmeas (AZ e salina) ($p = 0,004$ e $p = 0,001$) e inferiores com o tratamento com AZ ($p = 0,038$ e $p = 0,007$). A análise espectroscópica evidenciou um aumento da cristalinidade provocado pelo tratamento com AZ nas regiões cortical e medular, respectivamente, de hemimandíbulas direita e esquerda, bem como cortical femoral, com significância estatística. Houve aumento significativo da cristalinidade em esmalte dental e dentina coronária e radicular com o tratamento (AZ). A interação entre os fatores evidenciou que houve diminuição da razão hidroxiprolina-prolina em dentina coronária e aumento da cristalinidade em dentina radicular de fêmeas. Conclui-se que o tratamento com AZ, apesar de associado à ocorrência de OM, modifica a matriz mineral osseodentária, contribuindo para melhoria da biomecânica tecidual. Fêmeas apresentam diferenças nas propriedades biomecânicas femorais, e possuem menor densidade de osso trabecular na região alveolar pós-exodontia, quando comparadas aos machos.

Palavras-Chave: Bisfosfonatos; Qualidade óssea; Arcada Osseodentária; Dente; Fraturas Femorais.

ABSTRACT

Zoledronic acid (ZA) is incorporated into bone through its affinity for hydroxyapatite crystals, which can lead to structural and physico-chemical changes in mineralized tissues. The aim of this study was to analyze the physico-chemical and morphostructural properties of bone and dental tissue of mice submitted to a model of osteonecrosis of the jaws (OJ) related to chronic use of ZA. This is an experimental study, *ex vivo*, of a 2x2 factorial design, whose factors had two levels: male and female (sex) and ZA and Saline (treatment). The study had eight animals per group and was performed in duplicate. After three weekly administrations (days 0, 7, 14) of AZ 1.0 mg / kg or saline, the lower left 2nd molar (day 42) extraction was performed. Further administration was accomplished (day 49) and, subsequently, euthanasia (day 70). Samples were analyzed by Raman spectroscopy, conventional optical microscopy (histological and histomorphometric analysis), three-point bending test and computerized microtomography. Quantitative data (mean \pm SEM) were compared using ANOVA 2-way / Bonferroni (sex and treatment), or one-way ANOVA and 2-way for repeated measures / Bonferroni, considering, for all analysis, $p < 0.05$. The body mass of the animals, although increasing significantly with time, was not influenced by sex ($p = 0.216$) or treatment ($p = 0.544$). Treatment with ZA promoted histological alterations in femoral epiphyseal structure and increased the percentage of empty osteocytes and apoptotic osteoclasts, the number of total inflammatory cells and polymorphonuclear cells ($p < 0.05$) at sites of exodontia. Additionally, animals treated with ZA had a significantly lower number and greater separation of bone trabeculae, as well as a smaller ratio between bone volume and tissue volume in alveolar trabecular bone. Females (ZA and saline) presented a significantly lower value of this parameter. Regarding the mechanical properties of femoral bone, sex and treatment factors exerted an independent influence, respectively, on the cross-sectional area ($p < 0.001$ and $p = 0.001$), maximum load ($p < 0.001$ and $p < 0.001$) ($p < 0.001$ and $p < 0.001$) and work to fracture ($p < 0.001$ and $p = 0.030$) parameters, being lower in females and increased in treated animals (ZA), which also presented higher flexural stiffness. Yield stress and flexural modulus, respectively, were higher in females (ZA and saline) ($p = 0.004$ and $p = 0.001$) and lower with ZA treatment ($p = 0.038$ and $p = 0.007$). Spectroscopic analysis showed an increase in crystallinity caused by ZA treatment in cortical and medullary regions of right and left hemimandibula, respectively, as well as femoral cortical, with statistical significance. There was a significant increase of crystallinity in dental enamel, coronary and radicular dentin with treatment (ZA). The factors interaction showed a decrease of hydroxyproline-to-proline ratio in coronary dentin and increased crystallinity in females radicular dentin. It is concluded that treatment with ZA, although associated with occurrence of OJ, modifies bone and dental mineral matrix, contributing to tissue biomechanics' improvement. Females present differences in femoral biomechanical properties and have a lower density of trabecular bone in the post-dental extraction socket, when compared to males.

Key Words: Diphosphonates; Bone Quality; Jaw; Tooth; Femoral Fractures.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura	Página
Figura 1 – Molécula de pirofosfato inorgânico e de bisfosfonato.	21
Figura 2 – Protocolo experimental de terapia crônica com AZ e indução da OM em camundongos tratados com AZ ou solução salina.	31
Figura 3 – Ilustração de realização do teste de flexão de três pontos.	34
Figura 4 – Ilustração da área de secção transversal do osso femoral, mostrando as medidas necessárias para o cálculo da área.	35
Figura 5 – Ilustração do gráfico força-deformação gerado a partir dos dados obtidos no teste de flexão de três pontos.	36
Figura 6 – Ilustração dos pontos de aquisição do espectro Raman.	38
Figura 7 – Aspecto microscópico da região epifisária femoral.	43
Figura 8 – Aspecto microscópico da região de exodontia dos grupos experimentais.	44
Figura 9 – Cortes sagitais da região de exodontia (hemimandíbula esquerda) de animais tratados com AZ ou salina.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Tabela 1 – Distribuição de amostras de acordo com a metodologia empregada por grupo.	31
Tabela 2 – Massa corpórea dos animais ao longo dos dias experimentais.	40
Tabela 3 – Análise histomorfométrica da área de exodontia dos grupos experimentais.	42
Tabela 4 – Variáveis microtomográficas analisadas em hemimandíbulas esquerdas de camundongos tratados com AZ ou solução salina e submetidos ao procedimento de exodontia.	45
Tabela 5 – Parâmetros mecânicos obtidos através do teste de flexão de três pontos em camundongos fêmeas e machos tratados com AZ ou solução salina.	47
Tabela 6 – Variáveis espectroscópicas em região de osso cortical femoral e hemimandibular	48
Tabela 7 – Variáveis espectroscópicas em região de osso medular hemimandibular	49
Tabela 8 – Variáveis espectroscópicas do dente (esmalte, dentina coronária e dentina radicular).	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – adenosina trifosfato

AZ – ácido zoledrônico

AZF – Camundongos fêmeas tratados com AZ

AZM – Camundongos machos tratados com AZ

Ca – Cálcio

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EPM – Erro padrão da média

MicroTC – Microtomografia computadorizada

NPDM – Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos

OM – Osteonecrose dos Maxilares relacionada a Medicamentos

OPG - Osteoprotegerina

P - Fósforo

RANKL - ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa B

SALF – Camundongos fêmeas tratados com solução salina

SALM – Camundongos machos tratados com solução salina

UFC – Universidade Federal do Ceará

VO – volume ósseo

VT – volume tecidual

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
3. JUSTIFICATIVA	28
4. OBJETIVOS.....	29
4.1. Objetivo Geral.....	29
4.2. Objetivos Específicos	29
5. HIPÓTESES	30
6. METODOLOGIA.....	31
6.1. Aspectos éticos	31
6.2. Delineamento do estudo, cálculo amostral e protocolo experimental	31
6.3. Preparo e confecção de lâminas histológicas para microscopia óptica convencional ...	33
6.4. Análise histomorfométrica.....	33
6.5. Microtomografia computadorizada (MicroTC)	34
6.6. Teste de flexão de três pontos (F ₃ P)	35
6.7. Preparo das amostras e análise por espectroscopia Raman	38
6.8. Análise estatística	40
7. RESULTADOS	41
8. DISCUSSÃO	52
9. CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)....	66

1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo consiste em um tecido conjuntivo especializado, constituído por células, fibras colágenas e por uma matriz extracelular calcificada. Trata-se de uma estrutura multifuncional cujo metabolismo encontra-se constantemente ativo. Dentre suas diversas funções, cita-se a sustentação, proteção, movimentação, armazenamento iônico, além do imprescindível papel na homeostase dos íons cálcio e fosfato, regulada pela interação com outros órgãos (ex: rins e intestino), bem como por hormônios como paratormônio (PTH), calcitonina e 1,25-di-hidroxicolecalciferol (vitamina D) (SHARAWAT; DAWMAN, 2019; SZULC, 2018).

O metabolismo ósseo é orquestrado pelo fisiológico e constante processo de remodelação, que é majoritariamente responsável pela renovação e manutenção da qualidade da estrutura esquelética. A remodelação óssea ocorre através de eventos de reabsorção e formação tecidual, que acontecem de forma interligada. O predomínio de um evento sobre o outro pode, por conseguinte, repercutir em ganho ou perda de massa óssea (INFANTE et al., 2019; OWEN; REILLY, 2018).

Diversos fatores, de natureza intrínseca ou extrínseca, regulam ou podem interferir nesse processo. Dentre os quais, podemos citar fatores como idade, fatores hormonais, doenças metabólicas e/ou osseodegenerativas e tratamento farmacológico (KOKORELIS et al., 2019; BOUXSEIN et al., 2018; HOGBERG et al., 2018; DRABKIN et al., 2017)

Enquanto há um constante aumento da expectativa de vida, as doenças degenerativas em geral têm se tornado uma grande preocupação à saúde pública. No que se refere às doenças degenerativas do tecido ósseo, embora existam terapias mais avançadas, as terapias comumente utilizadas variam desde a reposição hormonal e a suplementação de cálcio ou vitamina D até o tratamento farmacológico com fármacos inibidores da remodelação óssea, como é o caso dos bisfosfonatos (KOKORELIS et al., 2019; SANDERSON et al., 2016; CHANG et al., 2011)

Fármacos amplamente utilizados no tratamento sistêmico de doenças osseodegenerativas como a osteoporose, alguns bisfosfonatos, como o ácido zoledrônico (AZ) também exercem efeitos antitumorais, sendo empregados no manejo e no controle algico de doenças como o mieloma múltiplo e metástases ósseas (AHMAD et al., 2018; MHASKAR et al., 2017).

Atuam, portanto, inibindo a reabsorção óssea, o que também corrobora com o aumento da densidade mineral tecidual e repercute na diminuição do risco de fraturas patológicas ocasionadas pela doença. Tais fraturas são justificadas pelo aumento da porosidade e diminuição da densidade e da resistência óssea. No entanto, o tratamento prolongado com bisfosfonatos tem sido associado à ocorrência de fraturas atípicas, acometendo principalmente a região diafisária e subtrocanterica femoral. Dessa forma, pode-se afirmar que tanto a quantidade quanto a qualidade do tecido ósseo influenciam fortemente na propensão óssea à fratura (AL-ASHQAR et al., 2017; GEISSLER; BAJAJ; FRITTON, 2015; SHANE et al., 2014).

O tratamento com bisfosfonatos é, ainda, fortemente relacionado à ocorrência de osteonecrose, desordem também associada ao tratamento com outras drogas antirreabsortivas. Os maxilares, particularmente a região mandibular, constituem os sítios mais afetados por essa condição, recentemente classificada como Osteonecrose dos Maxilares Relacionada a Medicamentos (OM). Embora essa desordem possa ocorrer espontaneamente, a maioria dos casos está relacionada ao procedimento de extração dentária (RUGGIERO et al., 2014; BARASCH et al., 2011)

Pacientes com idade avançada e do sexo feminino apresentam uma maior tendência ao desenvolvimento de OM, especialmente sob tratamento com bisfosfonatos em altas doses. Além disso, alterações mecânicas ósseas também parecem ser mais comuns em mulheres, pela maior incidência de desordens osseodegenerativas em pacientes do sexo feminino (muitas delas associadas à diminuição nos níveis de estrógeno) (SANDERSON et al., 2016; SCOLETTA et al., 2013; CHANG et al., 2011; SILVERMAN; LANDESBURG, 2009; AKKUS; ADAR; SCHAFFLER, 2004).

Bisfosfonatos possuem uma alta afinidade pela molécula de hidroxiapatita, principal molécula presente no conteúdo inorgânico de tecidos mineralizados, o que justifica a potência e a alta concentração desses fármacos em tecido ósseo (HENNEMAN et al., 2008; GRAHAM; RUSSELL, 2007).

O AZ pertence a uma geração particular de bisfosfonatos (aminobisfosfonatos) que possuem uma potência e estabilidade química ainda maior, quando comparada às demais gerações. Apesar de ainda existirem estudos com resultados controversos, a literatura evidencia que o AZ promove, em geral, benefícios nas propriedades físico-químicas de tecido ósseo. A OM, por sua vez, é a principal complicação associada à terapia com bisfosfonatos, ainda sem etiopatogênese definida. No entanto, já é postulado no meio científico que

sequestros ósseos encontrados na OM apresentam modificações em nível molecular e organizacional (AREF et al., 2016; OLEJNIK et al., 2014). Entretanto, até o momento, não existem estudos estabelecendo uma relação direta entre tais alterações induzidas por bisfosfonatos e uma maior ou menor predisposição ao aparecimento e/ou instalação de OM.

Pesquisas *in vivo* demonstraram que, ao se aderir à molécula de hidroxiapatita, o AZ promove modificações tanto na rede cristalina quanto na matriz orgânica tecidual, interferindo direta ou indiretamente na estabilidade da matriz de colágeno (JUILLARD et al., 2010; YERRAMSHETTY; AKKUS, 2008). Dessa forma, substratos mineralizados como tecido ósseo e dentário, dos quais a hidroxiapatita é o principal componente inorgânico, poderiam, teoricamente, ser facilmente afetados em nível de estrutura e estabilidade molecular pelos bisfosfonatos.

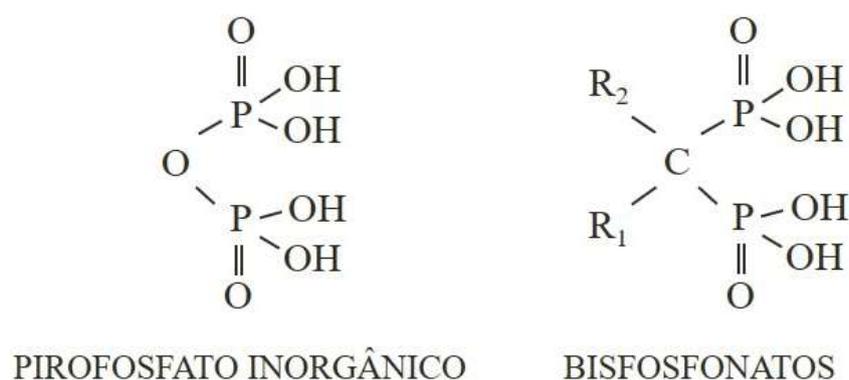
Pacientes em uso de bisfosfonatos possuem, ainda, um maior risco de desenvolvimento de pulpíte, uma vez que o perfil imunocelular do tecido pulpar é modificado pelo uso de AZ em modelos *in vivo* (SILVA et al., 2019, SILVA et al., 2016). No entanto, o mecanismo pelo qual ocorrem as alterações decorrentes da terapia com bisfosfonatos no tecido dental ainda não é bem estabelecido, nem tampouco existem evidências de incorporação desses fármacos aos dentes, visto que a estrutura e o metabolismo ósseo diferem do dentário.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Bisfosfonatos

Bisfosfonatos são fármacos análogos do pirofosfato inorgânico, um regulador endógeno do metabolismo ósseo. A estrutura química dos bisfosfonatos difere da molécula de pirofosfato por possuir, ao invés de um átomo de oxigênio, um átomo de carbono ligado a dois grupamentos fosfato. Tal substituição torna a molécula do bisfosfonato bem mais resistente, quando comparado ao pirofosfato inorgânico, que é um composto relativamente instável e vulnerável à hidrólise e à ação de enzimas. Além disso, permite a existência de mais dois grupamentos substituintes ligados covalentemente ao átomo de carbono (R1 e R2), que variam de acordo com o fármaco (Figura 1) (HEYMANN et al., 2004).

Figura 1 – Molécula de pirofosfato inorgânico e de bisfosfonato.



Fonte: Elaborada pelo autor

Tais grupamentos substituintes podem possuir átomos de carbono, nitrogênio, oxigênio, enxofre ou halogênio, dependendo da estrutura de cada bisfosfonato. A presença de nitrogênio na composição dos mesmos permite a classificação desses fármacos em aminobisfosfonatos (contém nitrogênio), e bisfosfonatos não-aminados (não contém nitrogênio). A presença de nitrogênio interfere na potência e, por conseguinte, na meia vida desses compostos, por aumentar ainda mais sua afinidade a íons bivalentes, como o cálcio (GRAHAM; RUSSELL, 2007; HEYMANN et al., 2004; ROGERS et al., 2000).

Ao serem incorporados no tecido ósseo, os bisfosfonatos agem através da inibição da função osteoclástica, bem como pela indução de apoptose dessas células. Diferentemente

dos bisfosfonatos de primeira geração (ex: etidronato), cujo mecanismo de ação se dá unicamente pela formação de análogos citotóxicos do ATP, os aminobisfosfonatos também atuam na via do mevalonato (através da inibição das enzimas farnesil difosfato e geranilgeranildifosfato sintases), comprometendo a síntese de colesterol e, conseqüentemente, as características citoarquiteturais e funcionais dessas células (CREMERS; PAPAPOULOS, 2011; GRAHAM; RUSSELL, 2007; COXON et al., 2000).

Os bisfosfonatos são empregados no tratamento de desordens osseodegenerativas como a osteoporose, doença de Paget e o mieloma múltiplo, por apresentarem bons efeitos no que se refere à diminuição do turnover ósseo. Aminobisfosfonatos exercem, ainda, diversos efeitos antitumorais. Dentre eles, cita-se a inibição da adesão da célula tumoral à matriz extracelular, indução da apoptose e inibição da invasão tumoral, bem como efeitos antiangiogênicos. Consistem, portanto, na terapia padrão no manejo de pacientes com mieloma múltiplo e câncer em estágio avançado associado a metástases ósseas (POZZI et al., 2009; VAHTSEVANOS et al., 2009; ROGERS et al., 2000).

Podem ser administrados por via oral ou endovenosa. A administração por via endovenosa apresenta maior biodisponibilidade e evita efeitos adversos no trato gastrointestinal, facilitando a aderência do paciente ao tratamento. São excretados pelos rins, sem sofrer metabolização no fígado. Devido à sua grande afinidade por íons bivalentes, os bisfosfonatos tendem a ligar-se fortemente aos cristais de hidroxiapatita, o que contribui para que cerca de 60% da dose administrada permaneça aderida ao tecido ósseo (KOS, 2014; WEISS et al., 2008; WOO; HELLSTEIN; KALMAR, 2006; GREEN, 2004; GREEN; ROGERS, 2002).

Estudos envolvendo farmacocinética e farmacodinâmica de bisfosfonatos demonstram a alta afinidade desses fármacos pelo tecido ósseo. Os mecanismos de incorporação do fármaco à molécula de hidroxiapatita obedecem o modelo de adsorção de Langmuir e explicam que, ao contrário do que se pensava, o efeito “cumulativo” dos bisfosfonatos no tecido ósseo se dá por um equilíbrio entre a estrutura cristalina da matriz mineral com a concentração de bisfosfonatos, ao invés da simples acumulação pela repetição das doses administradas. Tal equilíbrio depende, portanto, da dose do fármaco e da afinidade de ligação relativa à hidroxiapatita, sendo os aminobisfosfonatos, especialmente o AZ, os que apresentam maior afinidade à superfície tecidual (HOKUGO et al., 2013; CREMERS; PAPAPOULOS, 2011; HENNEMAN et al., 2008; WEISS et al., 2008)

A via de administração dos bisfosfonatos é uma das variáveis que influenciam potência do fármaco. O rápido aumento da concentração plasmática, associado a uma alta afinidade e rápida absorção de AZ pelo tecido ósseo resulta em uma menor quantidade de fármaco excretada no *clearance* renal. Isso explica a presença de AZ, mesmo em baixas concentrações, em conteúdo plasmático de ratos após 240 dias da última administração do fármaco, resultante de sua liberação paulatina pelo tecido ósseo (WEISS et al., 2008).

No entanto, o tratamento com esses fármacos suprime o turnover ósseo de tal forma que torna o tecido hipovascularizado, hipocelularizado e friável, deixando-o cada vez mais vulnerável e sensível frente a microtraumas. Além do risco de fratura patológica, existem algumas complicações orais relacionadas à terapia com bisfosfonatos, tais como lesões de mucosa oral e a osteonecrose dos maxilares, e o uso prolongado de bisfosfonatos, torna o paciente mais vulnerável a essa última desordem citada (SILVERMAN; LANDESBURG, 2009).

Osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos

A Osteonecrose dos Maxilares Relacionada a Medicamentos é definida como uma exposição óssea ou osso sondável por fistula intra/extraoral, localizada na região maxilo-facial, que persista por mais de 8 semanas na ausência de outra alteração óssea potencial, como é visto na doença óssea metastática ou nas lesões associadas à radioterapia. Além disso, deve-se constatar história de tratamento com agentes antireabsortivos ou antiangiogênicos (BORROMEIO et al., 2014; RUGGIERO et al., 2014).

Considerada um dos principais efeitos adversos do tratamento com bisfosfonatos, a OM é uma desordem amplamente relacionada aos aminobisfosfonatos, como o AZ, por serem empregados em diversos protocolos de terapia oncológica, sendo administrados por via endovenosa em elevadas doses mensais (CREMERS; PAPAPOULOS, 2011; EZRA; GOLOMB, 2000).

Dentre os fatores de risco para essa desordem, pode-se citar: histórico de trauma recente, principalmente traumas dentoalveolares, como exodontias; algumas condições sistêmicas, tais como hiperparatireoidismo e diabetes; duração da terapia com bisfosfonatos; anatomia do maxilar, uma vez que a densidade do trabeculado ósseo mandibular é maior em relação ao da maxila; sexo do paciente e o tipo de bisfosfonato (TSAO et al., 2013; MOZZATI; ARATA; GALLESIO, 2012; BARASCH et al., 2011; SILVERMAN; LANDESBURG, 2009).

Uma revisão de literatura feita por WOO et al., em 2006, apresentou 368 relatos de caso de OM, que manifestaram exposições de tecido ósseo na região de mandíbula (65%), maxila (26%) ou ambas (9%). As lesões apresentavam predileção pelo sexo feminino, e aproximadamente um terço eram sintomáticas. A ocorrência multifocal foi mais comum na região de maxila, e a maioria das lesões localizava-se na porção posterior e lingual da mandíbula, próximo à linha milohioide.

Estudos experimentais de indução de OM por procedimentos de exodontia revelam, por microtomografia computadorizada, áreas de osteólise e perda da integridade da região de alvéolo dental. Além disso, animais saudáveis submetidos a exodontia tratados com AZ apresentam ausência ou deficiência de cicatrização do alvéolo dental, com ocasionais presenças de espículas (sequestros) ósseos intra-alveolares, quando comparados aos grupos controle (CURRA et al., 2016; SOUNDIA et al., 2016).

A presença de OM associa-se à diminuição da qualidade do osso afetado. Variações na densidade da matriz óssea têm sido relacionadas à presença de sequestros ósseos de pacientes apresentando OM. Além disso, estudos envolvendo propriedades físico-químicas de sequestros ósseos associados a bisfosfonatos, apesar de escassos, demonstram uma hipermineralização e a ocorrência de modificações estruturais do mineral apatítico nesses espécimes (OLEJNIK et al., 2014; ALLEN; RUGGIERO, 2009).

Alterações físico-químicas em tecidos mineralizados

O tecido ósseo, assim como o tecido dentário, é composto por substâncias orgânicas e inorgânicas, sendo a porção mineral responsável por cerca de 70% da composição tecidual. O termo “qualidade óssea” engloba diversas propriedades, além da massa óssea (relacionada à densidade mineral), que influenciam na capacidade do tecido de suportar cargas. Cita-se como principais propriedades a geometria cortical, arquitetura esponjosa, microestrutura e composição tecidual. O turnover ósseo é um dos fatores mais importantes para a manutenção da qualidade óssea, sendo intensamente ativo em regiões de osso medular (80%) quando comparado ao osso cortical (20%) (COLE; VAN DER MEULEN, 2011; CUKROWSKI et al., 2007).

O cálcio (Ca) e o fósforo (P) são dois elementos abundantemente encontrados em tecidos biológicos. O componente mineral do osso, dentina e esmalte dentário é fosfato de cálcio apatítico contendo carbonato. Sódio, magnésio e outros componentes também são encontrados em menor quantidade. A hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$), por sua vez, é uma

molécula predominante no conteúdo mineral do tecido ósseo e dentário (REY et al., 2010; PASTERIS; WOPENKA; VALSAMI-JONES, 2008).

Variações na qualidade óssea derivam de alterações composicionais desses tecidos, o que repercute nas propriedades físico-químicas e biomecânicas (FELICE et al., 2015; MANDAIR; MORRIS, 2015).

Técnicas de espectroscopia vibracional, como espectroscopia Raman, são excelentes ferramentas para caracterização de substâncias, bem como detecção de alterações composicionais e bioquímicas em nível de estrutura molecular. No que se refere ao tecido ósseo, por exemplo, já é bem estabelecido que alterações composicionais podem refletir nas propriedades biomecânicas teciduais (PASCHALIS; GAMSJAEGER; KLAUSHOFER, 2017; MANDAIR; MORRIS, 2015).

Um estudo prévio de indução de metástase óssea constatou que os tecidos acometidos pelo tumor apresentavam alterações de parâmetros espectroscópicos, demonstrando que a degeneração óssea proveniente da atividade tumoral repercute não apenas na densidade mineral óssea, mas na qualidade tecidual, interferindo também em aspectos composicionais e organizacionais do osso afetado (BI et al., 2013).

A cristalinidade representa o tamanho do cristal e a estabilidade da rede cristalina que constitui a matriz mineral óssea. Os bisfosfonatos são incorporados ao tecido ósseo através de sua grande afinidade por cristais de hidroxiapatita. Promovem, por conseguinte, diversas modificações organizacionais nessas moléculas. A espectroscopia Raman, dentre outras metodologias, tem sido amplamente utilizada na avaliação de tais alterações em tecidos mineralizados e, especificamente, a cristalinidade corresponde ao inverso da largura máxima na metade da altura do pico $\nu_1\text{PO}_4$. Alguns estudos têm demonstrado que aumentos na cristalinidade podem representar uma maior estabilidade da estrutura mineral e interferir nos parâmetros mecânicos do tecido (MANDAIR; MORRIS, 2015; HOFSTETTER et al., 2014; OLEJNIK et al., 2014; JUILLARD et al., 2010; PASTERIS et al., 2004).

Fármacos como risedronato e alendronato, mesmo sendo utilizados em doses apropriadas para o tratamento da osteoporose, provocam diferentes alterações relacionadas à qualidade tecidual em superfícies de neoformação óssea. O AZ, por sua vez, além das modificações organizacionais dos cristais de apatita, promove o aumento da cristalinidade e a diminuição na estabilidade do colágeno (evidenciada através da redução da razão entre os

picos hidroxiprolina e prolina, por espectroscopia Raman) (OLEJNIK et al., 2016; HOFSTETTER et al., 2012).

Outros estudos revelam que o tratamento com AZ modifica o perfil composicional e cristalino do tecido ósseo, associando-o a uma maior resistência do tecido. No entanto, sabe-se que a interação entre a rede cristalina e a matriz orgânica rege e impacta diretamente na qualidade do osso. Por isso, diante da complexidade e do metabolismo do tecido ósseo, não existe um parâmetro avaliado por espectroscopia Raman que possa prever o comportamento biomecânico tecidual (LLOYD et al., 2017; NEWMAN et al., 2014; COLE; VAN DER MEULEN, 2011; YERRAMSHETTY; AKKUS, 2008).

A terapia crônica com bisfosfonatos promove alterações em nível tanto estrutural quanto composicional da estrutura óssea, o que pode repercutir nas suas propriedades mecânicas (diminuição da resistência cortical à propagação de forças), podendo ocasionar o que a literatura descreve como fraturas atípicas. No entanto, a relação de risco-benefício da terapia com bisfosfonatos ainda permanece altamente favorável para pacientes com desordens osseodegenerativas, visto que a diminuição do *turnover* ósseo nesses casos leva, dentre outros benefícios e na maioria dos pacientes, a uma diminuição do risco de fraturas (LLOYD et al., 2017; AREF et al., 2016).

Análises biomecânicas do tecido ósseo são cada vez mais utilizadas em estudos avaliando prognóstico e tratamento de doenças osseodegenerativas, através dos seus impactos na qualidade e resistência tecidual. Testes mecânicos de ossos inteiros avaliam a rigidez estrutural e a resistência tecidual a partir de dados obtidos de gráficos de carga-deformação. Tais propriedades são influenciadas diretamente pela quantidade de tecido, bem como pela distribuição geométrica e pelas propriedades do próprio material. Diversas são as variáveis que influenciam indiretamente nesses parâmetros, como sexo, idade, dieta e condição sistêmica do paciente. Dessa forma, estudos em animais permitem uma melhor padronização e controle metodológico para avaliação desses critérios (GEISSLER; BAJAJ; J. CHRISTOPHER FRITTON, 2015; NEWMAN et al., 2014; CORY et al., 2010; AKKUS; ADAR; SCHAFFLER, 2004).

3. JUSTIFICATIVA

O presente trabalho dá continuidade a trabalhos previamente publicados pelo nosso grupo de pesquisa, e utiliza um modelo de indução de OM por exodontia associada ao uso crônico de AZ já estabelecido, tendo como diferencial a utilização de animais machos e fêmeas e a busca de uma melhor compreensão dos efeitos causados pelo AZ no estabelecimento da OM e seu impacto nas propriedades físico-químicas e morfoestruturais do tecido ósseo e dental.

A relação entre risco e benefício do tratamento com bisfosfonatos ainda é favorável, apesar de o tratamento com esses fármacos poder repercutir em efeitos colaterais graves, como a OM e, ainda, as fraturas atípicas (ocorrendo menos frequentemente, no caso de tratamentos prolongados), o que constitui uma grande preocupação na clínica médica e odontológica.

A ocorrência dessas desordens já é bastante associada ao próprio mecanismo antirreabsortivo fármaco e, no caso da OM, ao caráter inflamatório dessa condição. No entanto, diante do contexto de alterações composicionais e físico-químicas teciduais ocasionadas pelo tratamento com bisfosfonatos, em especial com AZ, faz-se necessária a melhor compreensão dessas alterações e sua possível associação com essas desordens citadas.

Tais alterações em tecidos mineralizados, tanto no osso como no dente, possivelmente estão relacionadas à alta afinidade e às modificações induzidas por bisfosfonatos em cristais de hidroxiapatita, direta ou indiretamente, mesmo frente às diferenças metabólicas entre esses tecidos. No entanto, até onde se sabe, não existem estudos avaliando as repercussões do tratamento crônico com AZ na estrutura mineralizada dental.

Compreender, pois, os mecanismos pelos quais essas alterações são ocasionadas, através da análise do perfil físico-químico e morfoestrutural do tecido osseodentário de camundongos submetidos a modelo de indução de OM por tratamento crônico com AZ, se configura como objetivo deste estudo.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Analisar as propriedades físico-químicas e morfoestruturais do tecido osseodentário de camundongos machos e fêmeas submetidos a modelo de indução de OM por tratamento crônico com AZ.

4.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a influência do tratamento crônico com AZ nos parâmetros biomecânicos e morfoestruturais do tecido ósseo, bem como nos parâmetros físico-químicos tecido osseodentário de camundongos machos e fêmeas submetidos a modelo de indução de OM.
- Verificar a influência do sexo nos parâmetros físico-químicos e morfoestruturais do tecido osseodentário de camundongos tratados com AZ e submetidos ao procedimento de exodontia.

5. HIPÓTESES

A hipótese de nulidade (H_0) deste trabalho é a de que os fatores sexo e tratamento com AZ não repercutem em diferenças de propriedades físico-químicas e morfoestruturais no tecido osseodentário de camundongos submetidos a modelo de indução de OM.

A hipótese alternativa (H_1) é a de que existem diferenças nessas propriedades, sejam elas inerentes ao sexo dos animais e/ou ao tratamento com AZ.

6. METODOLOGIA

6.1. Aspectos éticos

O presente estudo é fundamentado no princípio dos 3R's (*Reduction, Refinement and Replacement*), que norteia as condutas éticas de experimentação animal, sendo submetido e aprovado (protocolo 89/17) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina – UFC (ANEXO A).

6.2. Delineamento do estudo, cálculo amostral e protocolo experimental

Trata-se de um estudo experimental, de delineamento fatorial 2x2, cujas variáveis independentes analisadas foram os fatores sexo e tratamento, ambos possuindo dois níveis. O estudo contou com oito unidades experimentais em cada grupo e foi realizado em duplicata para contemplar todas as metodologias propostas, de acordo com a Tabela 1.

O cálculo amostral foi baseado no estudo de Hornby e colaboradores (2003), que observou redução do crescimento longitudinal de tíbias de ratas tratadas com 7,5 ug/kg de AZ ($2,00 \pm 1,79 \mu\text{m}/\text{dia}$, média \pm DP) em relação a ratas não tratadas ($4,60 \pm 1,34 \mu\text{m}/\text{dia}$, média \pm DP); Dessa forma, estimou-se necessário avaliar um total de oito camundongos por grupo, a fim de se obter uma amostra que represente com 90% de poder e 95% de confiança a hipótese alternativa deste trabalho (HORNBY et al., 2003).

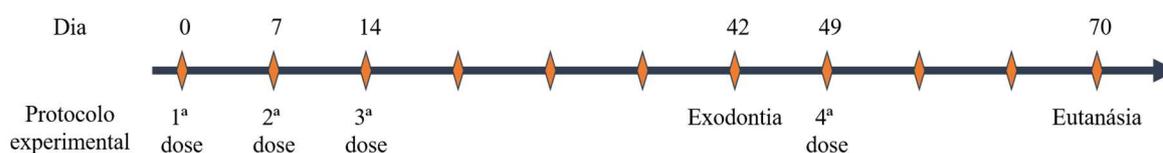
Os animais utilizados nesta pesquisa pertenciam à espécie *mus musculus* e à linhagem Swiss, mantidos em condições ideais de experimentação animal. O protocolo experimental foi adaptado de estudos anteriores (SILVA et al., 2016; SILVA et al., 2015) realizou-se administração crônica de AZ 1,0 mg/kg ou solução salina (dias 0, 7, 14 e 49) por via intravascular. Realizou-se, ainda, o procedimento cirúrgico de exodontia (dia 42) do segundo molar inferior esquerdo, sob anestesia (quetamina 100 mg/kg e xilazina 10 mg/kg, via intraperitoneal) e com cuidados pós-operatórios, e a eutanásia (dia 70), por sobredose anestésica, (pentobarbital 150mg/kg + lidocaína 10 mg/mL) para coleta de amostras de tecido ósseo de diferentes sítios anatômicos (hemimandíbulas e fêmures) (Figura 2). Os animais eram pesados semanalmente para fins de avaliação da massa corpórea ao longo do protocolo experimental. O dente extraído e as amostras de tecido ósseo foram posteriormente analisadas, de acordo com as metodologias posteriormente descritas.

Tabela 1 – Distribuição de amostras de acordo com a metodologia empregada.

Grupo	Nº Animais	Amostra	Metodologia
SALF	8	He, Hd, Fd, D	ER
		Fe	F ₃ P
	8	He	MO, MicroTC
		Fe	F ₃ P
		Fd	MO
AZF	8	He, Hd, Fd, D	ER
		Fe	F ₃ P
	8	He	MO, MicroTC
		Fe	F ₃ P
		Fd	MO
SALM	8	He, Hd, Fd, D	ER
		Fe	F ₃ P
	8	He	MO, MicroTC
		Fe	F ₃ P
		Fd	MO
AZM	8	He, Hd, Fd, D	ER
		Fe	F ₃ P
	8	He	MO, MicroTC
		Fe	F ₃ P
		Fd	MO

Fonte: Elaborada pelo autor; Legenda: SALF (camundongos fêmea tratados com solução salina); AZF (camundongos fêmea tratados com AZ); SALM (camundongos machos tratados com solução salina); AZM (camundongos machos tratados com AZ); He – Hemimandíbula esquerda; Hd – hemimandíbula direita; Fd – Fêmur direito; Fe – Fêmur esquerdo; D – Dente; MO – Microscopia óptica convencional; MicroTC – Microtomografia Computadorizada; F₃P – Flexão de três pontos.

Figura 2 - Protocolo experimental de terapia crônica com AZ e indução da OM em camundongos tratados com AZ ou solução salina.



Fonte: Elaborada pelo autor

6.3. Preparo e confecção de lâminas histológicas para microscopia óptica convencional

As amostras de hemimandíbula esquerda e de fêmur foram descalcificadas em solução de EDTA 10% (pH 7.3; NaOH, PA) durante 30 dias. Posteriormente, após análise macroscópica, as peças foram seccionadas, armazenadas em cassetes histológicos e seguidas para processamento automático (PT05, LupeTec[®], São Paulo, Brasil). Depois de processadas, as amostras foram incluídas em parafina fundida a 58 °C, a fim de se obter secções de 4 µm de espessura dos blocos parafinados, utilizando micrótomo rotativo semiautomático (RM2235, Leica Microsystems[®], Wetzlar, Alemanha).

As secções histológicas foram dispostas em lâminas de vidro, homogeneizadas e desparafinizadas em estufa (MD1.1, Medicate[®], São Paulo, Brasil) (65 °C) e em três banhos de xilol e, após reidratação em série alcoólica decrescente (álcool absoluto – álcool 70°), lavadas em água corrente (3 minutos) e coradas com a coloração de Hematoxilina-Eosina. Posteriormente, após lavagem em água corrente, as amostras foram desidratadas em série alcoólica crescente (álcool 70° - álcool absoluto) e fixadas em xilol (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

Após fixação, foi realizada a montagem com lamínulas de vidro através do meio de montagem Enthellan (Merck[®], Darmstadt, Alemanha) para posterior análise histológica descritiva das amostras de hemimandíbula esquerda e fêmur, bem como análise histomorfométrica das amostras de hemimandíbula esquerda em microscópio de luz convencional (CX41, Olympus[®], Tóquio, Japão).

6.4. Análise histomorfométrica

Após análise descritiva, as lâminas histológicas foram fotografadas em microscópio (DM 2000, Leica Microsystems[®]) com câmera acoplada (DFC295, Leica Microsystems[®]), através do software Leica Application Suite 4.3.0 (Leica Microsystems[®]). Foram obtidos cinco campos microscópicos no aumento de 400 x, no sítio referente à exodontia do segundo molar inferior esquerdo. Os campos selecionados correspondiam à borda anterior do alvéolo pós-extração e seguiu as áreas a serem fotografadas sempre avançando no sentido para posterior, de modo a não repetir as áreas fotografadas. As imagens foram exportadas para o software Image J[®] (*National Institute of Health* - NIH, Marilândia, Estados Unidos da América) e, através do comando *cell counter*, um operador (que desconhecia a que grupo pertencia cada animal) contou o número de lacunas de osteócitos vazias e com células viáveis, bem como o número de osteoclastos com vitalidade e com sinais

histológicos de apoptose (hipo ou hiperchromatismo nuclear e presença de múltiplos vacúolos intracitoplasmáticos) e o número de células inflamatórias mono e polimorfonucleares. Considerou-se o somatório dos campos de cada lâmina como unidade amostral, utilizando como parâmetros de análise quantitativa os percentuais de lacunas de osteócitos vazias e de osteoclastos em apoptose, bem como o número de células inflamatórias totais, mononucleares e polimorfonucleares neutrófilos (SILVA et al., 2015).

6.5. Microtomografia computadorizada (MicroTC)

As amostras de hemimandíbula esquerda de cada animal foram submetidas a uma avaliação radiográfica utilizando-se microtomografia computadorizada (MicroTC), por meio da qual foi considerada a reparação alveolar das hemimandíbulas operadas, bem como as propriedades ósseas da área de exodontia. Para isso, cada amostra foi posicionada verticalmente e de maneira centralizada em um recipiente no interior de um microtomógrafo (1172, SkyScan, Bruker®, Kontich, Bélgica), sendo utilizados, para a aquisição das imagens, os seguintes parâmetros: 80 kV, 124 μ A, tamanho do pixel de 9,01 μ m e 0,40 graus de rotação, rotação total de 180 graus, frames igual a 3 e filtro de alumínio de 0,5 mm. Após o escaneamento, as imagens foram importadas no software NReconstruction 1.7.03 (SkyScan, Bruker®), para reconstrução em escala de cinza, apresentando coeficientes de atenuação de raios-X com valores relacionados à estrutura óssea, selecionando-se os parâmetros de reconstrução de em média 570 cortes, suavização igual a 2, redução de artefatos em anel igual a 5% de correção de beam-hardening. Foi utilizado o software DataViewer (Skyscan, Bruker®) para ajustar o posicionamento das imagens das amostras, de forma a obter uma melhor visualização das regiões a serem analisadas (melhor visualização em cortes axiais, sagitais e coronais). Os cortes sagitais foram selecionados para a análise dos parâmetros microtomográficos.

Através do software CT Analyzer (CTAn) (Skyscan, Bruker®) foi realizada a seleção dos cortes sagitais que compreendessem a área de exodontia do segundo molar inferior. Posteriormente, foi determinada a região de interesse (ROI), através de interpolação dinâmica poligonal, compreendendo apenas a área correspondente à região de exodontia. Em seguida, os cortes foram binarizados (escala log mín 38 - máx 143), para obtenção do histograma e análise tridimensional, a partir da qual foram avaliados os parâmetros de densidade mineral óssea e variáveis relacionadas à região de osso trabecular, tais como razão entre volume de tecido ósseo (VO) e volume tecidual total (VT) da área de interesse (VO/VT), espessura trabecular, número e separação de trabéculas ósseas (LISBOA et al., 2015).

A análise por microTC seguiu o “guia para avaliação de microestrutura óssea em roedores utilizando microtomografia computadorizada” (BOUXSEIN et al., 2010).

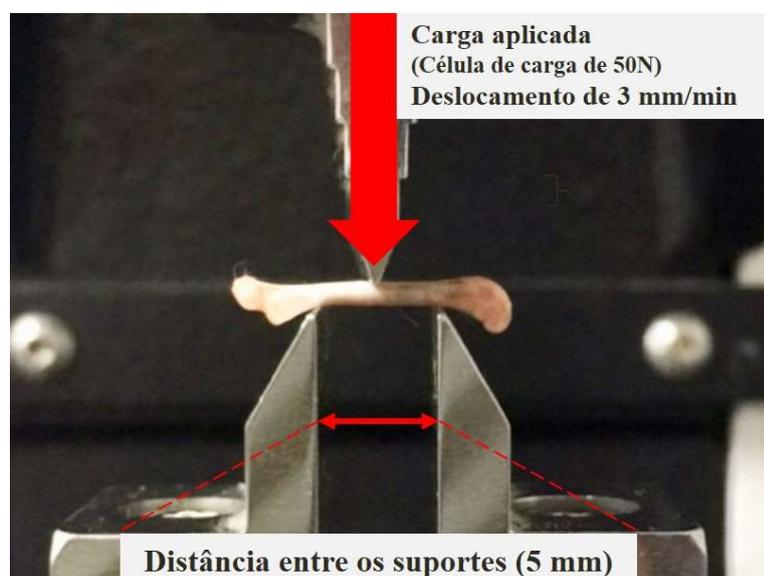
6.6. Teste de flexão de três pontos (F₃P)

O teste de flexão de três pontos foi o teste mecânico empregado neste estudo para as amostras de fêmur. Trata-se de um teste eficaz, de fácil execução e preparo das amostras. Além disso, é bastante utilizado em estudos experimentais biomecânicos com camundongos (CHANG et al., 2011; JÄMSÄ et al., 1998). Para a realização do referido teste, utilizou-se a máquina de ensaios universais (3345, Instron[®], Massachusetts, EUA), a fim de determinar os parâmetros mecânicos correspondentes ao comportamento do osso femoral em regime elástico e plástico até o momento da fratura.

Primeiramente, as medidas de espessura anteroposterior e mesiodistal do centro da diáfise de cada fêmur foram obtidas utilizando um paquímetro digital. Tais medidas foram inseridas no software Bluehill 2 (Instron[®]) antes da realização de cada teste.

Para a realização do teste, foi aplicado um módulo de carga de 50N, na velocidade de 3 mm/min. Cada fêmur foi igualmente posicionado (lado anterior voltado para cima) entre dois suportes, distando 5 mm entre si (BEER et al., 2015; AKHTER et al., 2004). Posteriormente, foi aplicada uma força no ponto central da diáfise femoral, entre os 2 suportes, de forma contínua até o momento da fratura, como ilustra a figura abaixo (Figura 3):

Figura 3 – Ilustração de realização do teste de flexão de três pontos

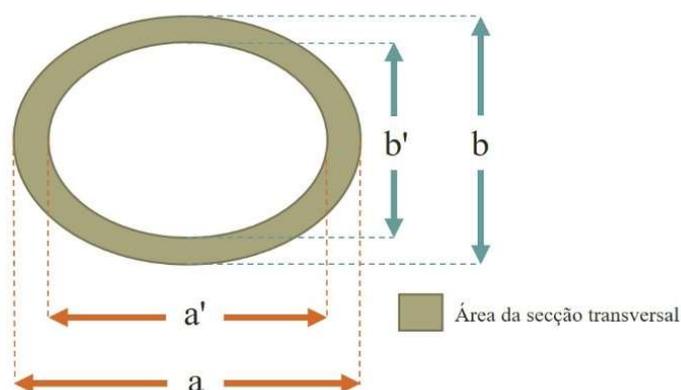


Fonte: elaborado pelo autor

Os valores obtidos consistiram na extensão (mm), carga (N), carga de flexão (N), extensão de flexão (mm), desde o início do teste até o momento da fratura. Tais valores eram obtidos a cada 0,02 segundos e automaticamente salvos em planilhas no software Microsoft Office Excel®, a partir do qual foi feita a análise dos dados.

Para realizar os cálculos dos parâmetros mecânicos após a realização do teste de flexão de três pontos, a secção transversal do fêmur foi analisada (considerada como uma secção elíptica oca), conforme a figura abaixo (Figura 4):

Figura 4 – Ilustração da área de secção transversal do osso femoral, mostrando as medidas necessárias para o cálculo da área.

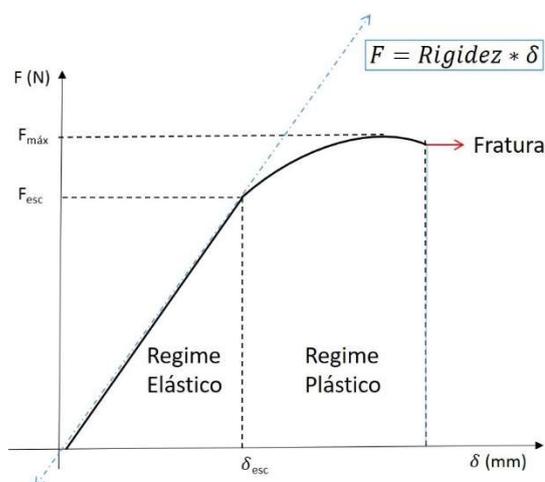


Fonte: elaborado pelo autor

Dessa forma, além da espessura mesiodistal (a) e anteroposterior (b), mensuradas antes da realização do teste, as medidas de espessura cortical da região lateral ($a-a_1$) e anterior ($b-b_1$) também foram obtidas para o cálculo da área de secção transversal do osso (S), através da fórmula $S = \frac{\pi(ab-a'b')}{4}$.

Os dados obtidos em cada ensaio foram utilizados para geração de um gráfico e posterior estabelecimento de uma linha de tendência em regime elástico (teoricamente uma reta cujo coeficiente angular é a rigidez), bem como determinação de ponto de escoamento (ponto no qual o gráfico força-deformação passa a não obedecer a linha de tendência) (Figura 5). O cálculo da área sob a curva também foi realizado, a fim de determinar a energia necessária e despendida pelo material até a quebra (trabalho total à fratura).

Figura 5 – Ilustração do gráfico força-deformação gerado a partir dos dados obtidos no teste de flexão de três pontos.



Fonte: elaborado pelo autor

A partir da área de secção transversal, pôde-se calcular os demais parâmetros. O momento de inércia tem relação com o grau de dificuldade em se alterar o estado de rotação da amostra, baseado no sentido de aplicação da força. Como a carga é aplicada no sentido y (sentido anteroposterior da secção transversal do fêmur), a tendência de flexão é um giro em torno do eixo x (sentido mesiodistal da secção transversal do fêmur). Reflete a distribuição da área de osso cortical ao redor de um eixo fixo de rotação passando pelo centro da seção cortical

no sentido do eixo x e pode ser calculado através da fórmula: $I_x = \frac{\pi(ab^3 - a'b'^3)}{64}$.

Os dados de carga máxima (máximo de carga aplicado durante o teste) e carga para escoamento (carga máxima no início da deformação plástica) permitem o cálculo da tensão máxima e tensão de escoamento, respectivamente, através da fórmula $\sigma = \frac{FLb}{8 \cdot I_x}$; $\sigma = \frac{5Fb}{8 \cdot I_x}$.

Considerando, ainda, a rigidez à flexão, que representa a rigidez do material em regime elástico, obtida pelo coeficiente angular da reta de crescimento de esforço, podemos deprender o valor do Módulo Flexural (E) (propriedade dos materiais que quantifica a resistência à deformação). No caso específico do ensaio de flexão de 3 pontos, o módulo flexural se refere à dificuldade de se fletir um material em específico, enquanto a rigidez mede a taxa de variação da força em função do deslocamento, ou seja, a dificuldade em fletir o corpo de prova no regime elástico):

$$\frac{dF}{d\delta}(\text{Rigidez}) = \frac{48EI_x}{L^3}; E = \text{Rigidez} * \frac{L^3}{48I_x}; E = 125 * \frac{\text{Rigidez}}{48I_x}$$

Os parâmetros mecânicos avaliados a partir do teste de flexão de três pontos foram os de área de secção transversal (mm²), carga máxima (N), carga para escoamento (N), rigidez à flexão (N/mm), tensão máxima (MPa), tensão de escoamento (MPa), módulo de flexão (MPa), momento de inércia (mm⁴) e trabalho total à fratura (Nmm) (BEER et al., 2015; AKHTER et al., 2004)

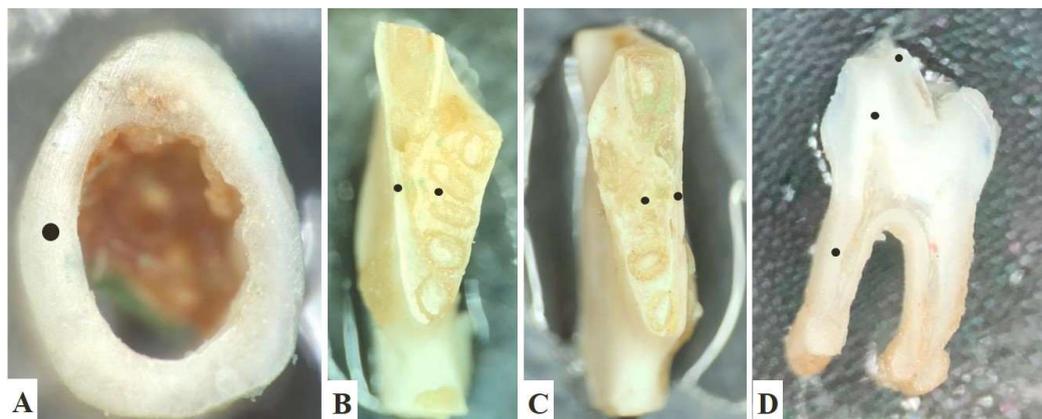
6.7. Preparo das amostras e análise por espectroscopia Raman

Todas as amostras coletadas (hemimandíbula direita e esquerda, fêmur e dente) foram avaliadas por meio de microespectrometria Raman (Alpha 300, WITec®, Ulm, Baden-Württemberg, Alemanha). As amostras de osso foram seccionadas de acordo com a área de interesse, utilizando uma cortadeira metalográfica de precisão (Isomet 4000, Buehler®, Uzwil, Suíça) e disco diamantado, sob irrigação com água destilada e em baixa velocidade (150RPM). Posteriormente, foram polidas com uma sequência de lixas de papel abrasivas de baixa granulação (1600, 1800, 2000), sob irrigação e durante 30 segundos cada. Devido às limitações de tamanho das amostras de dente, utilizou-se apenas o polimento com as lixas abrasivas, nas mesmas condições de irrigação. No entanto, um maior período de tempo foi necessário para a realização da secção transversal (até atingir a linha oclusal do dente). As amostras foram dispostas em cuba ultrassônica durante 10 minutos para a remoção de resíduos e posteriormente secas em papel absorvente.

Ao final das etapas de secção e polimento, as amostras foram observadas em estereomicroscópio (S8APO, Leica Microsystems®) para confirmação de visualização e polimento satisfatório da área de interesse para a realização das leituras.

Os espécimes foram submetidos a leituras em áreas distintas: para as amostras de fêmur, foi realizada uma leitura na região cortical. Para as amostras de hemimandíbula (direita e esquerda), realizou-se uma leitura na região cortical e uma leitura na região medular (região do segundo molar inferior). Para as amostras de dente, realizou-se uma leitura na região de esmalte, uma leitura na região de dentina coronária e uma leitura na região de dentina radicular (Figura 6).

Figura 6 – Ilustração dos pontos de aquisição do espectro Raman.



Imagens obtidas em lupa estereoscópica, ilustrando a região na qual foram realizadas a(s) aquisição(ões) dos espectros Raman (pontos pretos), na região de fêmur (A), hemimandíbulas direita (B) e esquerda (C), e segundo molar inferior esquerdo (D).

A distribuição espacial dos componentes orgânicos e inorgânicos foi determinada através das intensidades relativas correspondentes aos picos Raman. Foi utilizado um laser de argônio, com comprimento de onda de 532 nm e potência de 22,9mW, no aumento de 200x.

O espectro Raman foi obtido na faixa de 200 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} , com 24 segundos de análise e total de 6 acumulações por região (4 segundos por acumulação). A partir da análise da intensidade dos picos Raman, os parâmetros analisados foram:

- Relação matriz mineral/matriz orgânica, que é determinada pela intensidade do pico de fosfato banda ν_1 ($\sim 960\text{ cm}^{-1}$) dividido pela intensidade das bandas de cadeias laterais $\delta(\text{CH}_2)$ das moléculas de colágeno (1450 cm^{-1});
- Proporção de conteúdo de monohidrogenofosfato, determinada pela intensidade entre bandas de $\nu_3\text{HPO}_4$ (1003 cm^{-1}) e $\nu_1\text{PO}_4$ ($\sim 960\text{ cm}^{-1}$);
- Cristalinidade, determinada pelo inverso da largura total na metade da intensidade máxima (*full width at half maximum - FWHM*) da banda de $\nu_1\text{PO}_4$;
- Relação de substituição de carbonato tipo B, determinada pela intensidade entre as bandas CO_3 (1071 cm^{-1}) e $\nu_1\text{PO}_4$;
- Relação entre hidroxiprolina-prolina, que corresponde à intensidade entre bandas de prolina (855 cm^{-1}) e hidroxiprolina (870 cm^{-1});

(CARVALHO et al., 2018; CARVALHO et al., 2017; OLEJNIK et al., 2016). Os espectros foram avaliados através do software Project 2.08 (WITec®).

6.8. Análise estatística

Os dados foram tabulados no Microsoft Excel e exportados para o software *Statistical Package for the Social Sciences* (versão 17.0) para Windows. Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e expressos em forma de média \pm erro-padrão da média (EPM).

Para a variação de massa corpórea, utilizou-se o teste ANOVA one-way para medidas repetidas (considerando o fator tempo) seguido do pós-teste de Bonferroni e o teste ANOVA 2-way para medidas repetidas (considerando os fatores sexo e tratamento) seguido do pós-teste de Bonferroni. Para os demais parâmetros, a análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA 2-way, seguido do pós-teste de Bonferroni, aonde consideraram-se os fatores sexo e tratamento.

As variáveis independentes consideradas para o teste ANOVA-2-way possuíam dois níveis a saber: macho ou fêmea (fator sexo) e AZ ou salina (fator tratamento).

Para todos os testes a análises foi atribuído índice de confiança de 95%.

7. RESULTADOS

Os fatores sexo e tratamento não influenciaram na variação de massa corpórea dos animais ao longo do protocolo experimental.

Ao longo do protocolo experimental, os animais aumentaram significativamente a massa corpórea em todos os grupos experimentais, tanto os grupos de camundongos tratados com solução salina ($p=0,039$ e $p<0,001$) quanto com AZ ($p=0,013$ e $p=0,03$), machos e fêmeas, respectivamente. Portanto, os fatores sexo ($p=0,216$) e tratamento ($p=0,544$) não exerceram influência nesse parâmetro, nem tampouco a interação entre eles ($p=0,305$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Massa corpórea dos animais ao longo dos dias experimentais.

	SALF	AZF	SALM	AZM	p-Valor ^a	p-Valor ^b	p-Valor ^c
Massa corpórea							
Dia 0	21,13±0,67	20,46±0,38	27,42±0,57	25,46±0,59	0,305	0,216	0,544
Dia 7	24,04±0,73*	21,92±0,35*	30,58±0,71*	29,96±0,69*			
Dia 14	24,55±0,52	23,46±0,30*	31,96±0,67*	31,67±0,58*			
Dia 21	25,95±0,51*	24,71±0,27*	33,58±0,75*	32,75±0,56*			
Dia 28	27,20±0,52	26,13±0,30*	33,54±0,62	33,38±0,61			
Dia 35	28,65±0,65	26,79±0,37	35,75±0,71*	35,17±0,67*			
Dia 42	29,30±0,62	27,83±0,27	37,71±0,76*	37,08±0,70*			
Dia 49	27,85±0,86	27,17±0,65	36,54±1,12	36,75±0,72			
Dia 56	28,75±0,55	27,67±0,61	37,00±1,04	36,88±0,76			
Dia 63	29,40±0,97	29,00±0,63*	38,29±1,16*	37,42±0,85			
Dia 70	30,65±1,20	30,00±0,59	38,75±1,10	37,83±0,93			
p-Valor^d	<0,001	0,003	0,039	0,013			

Fonte: dados da pesquisa. Legenda: SALF (camundongos fêmea tratados com solução salina); AZF (camundongos fêmea tratados com AZ); SALM (camundongos machos tratados com solução salina); AZM (camundongos machos tratados com AZ); Teste ANOVA 2-way para medidas repetidas/Bonferroni (^ap-Valor da interação; ^bp-Valor do fator sexo; ^cp-Valor do fator tratamento); Teste ANOVA one-way para medidas repetidas/Bonferroni (^dp-Valor do fator tempo) (* $p<0,05$ em relação ao dia imediatamente interior) (média ± EPM; n=12/grupo)

O tratamento com AZ promove alterações histológicas na estrutura epifisária femoral, bem como alterações histológicas e histomorfométricas (considerando parâmetros estruturais e inflamatórios) em sítios de exodontia.

Nas amostras de fêmur de todos os grupos pôde-se observar, na região da diáfise femoral, a preservação das membranas periosteais e endosteais, bem como a presença de osso compacto lamelar íntegro em continuidade com a medula óssea.

A região epifisária dos animais era composta por trabéculas de osso esponjoso em meio a medula hematopoiética, na qual, no grupo salina, notou-se a presença de células adiposas e megacariócitos. Nos grupos tratados com solução salina, constatou-se a presença da linha epifisária (fina camada de cartilagem hialina associada a uma delgada região de osso em crescimento). Os grupos tratados com AZ, por sua vez, apresentaram uma região mais espessa da área de tecido ósseo em crescimento (compatível com tecido osteocondroide), refletindo um aumento do trabeculado ósseo dessa região, ainda que todos os animais utilizados no experimento tivessem o mesmo tempo de vida (Figura 7).

A análise microscópica das hemimandíbulas esquerdas dos grupos tratados com solução salina, machos e fêmeas, evidenciou, no septuagésimo dia experimental (28 dias após a exodontia), a presença de tecido ósseo viável, com lacunas de osteócitos preservadas. Mesmo notando-se a presença de infiltrado inflamatório em alguns animais, constatou-se a presença de reepitelização, e os osteoclastos presentes (em menor número) no sítio de exodontia, não apresentavam sinais histológicos sugestivos de apoptose (Figura 8).

Diferentemente, nos grupos tratados com AZ, apesar de se visualizar uma deposição de matriz óssea mineralizada, houve uma maior quantidade de lacunas de osteócitos vazias. Além disso, evidenciou-se a presença de sequestros ósseos, bem como de um intenso infiltrado inflamatório, predominantemente, neutrofílico. Constatou-se, ainda, a presença de um maior número de osteoclastos, cuja maioria apresentava sinais histológicos sugestivos de apoptose (hipo/hipercromasia e picnose nuclear, além de vacuolização citoplasmática) (Figura 8).

A análise histomorfométrica das hemimandíbulas esquerdas evidenciou que o tratamento com AZ foi responsável pela alteração da maioria dos parâmetros. Observou-se um aumento do percentual (%) de lacunas de osteócitos vazias ($p < 0,001$) e percentual de osteoclastos apoptóticos ($p < 0,001$), bem como um aumento no total de células inflamatórias ($p = 0,002$) e, particularmente, de células polimorfonucleares ($p < 0,001$), não estando

associado, no entanto, a alterações no número de células mononucleares ($p=0,476$) (Tabela 3).

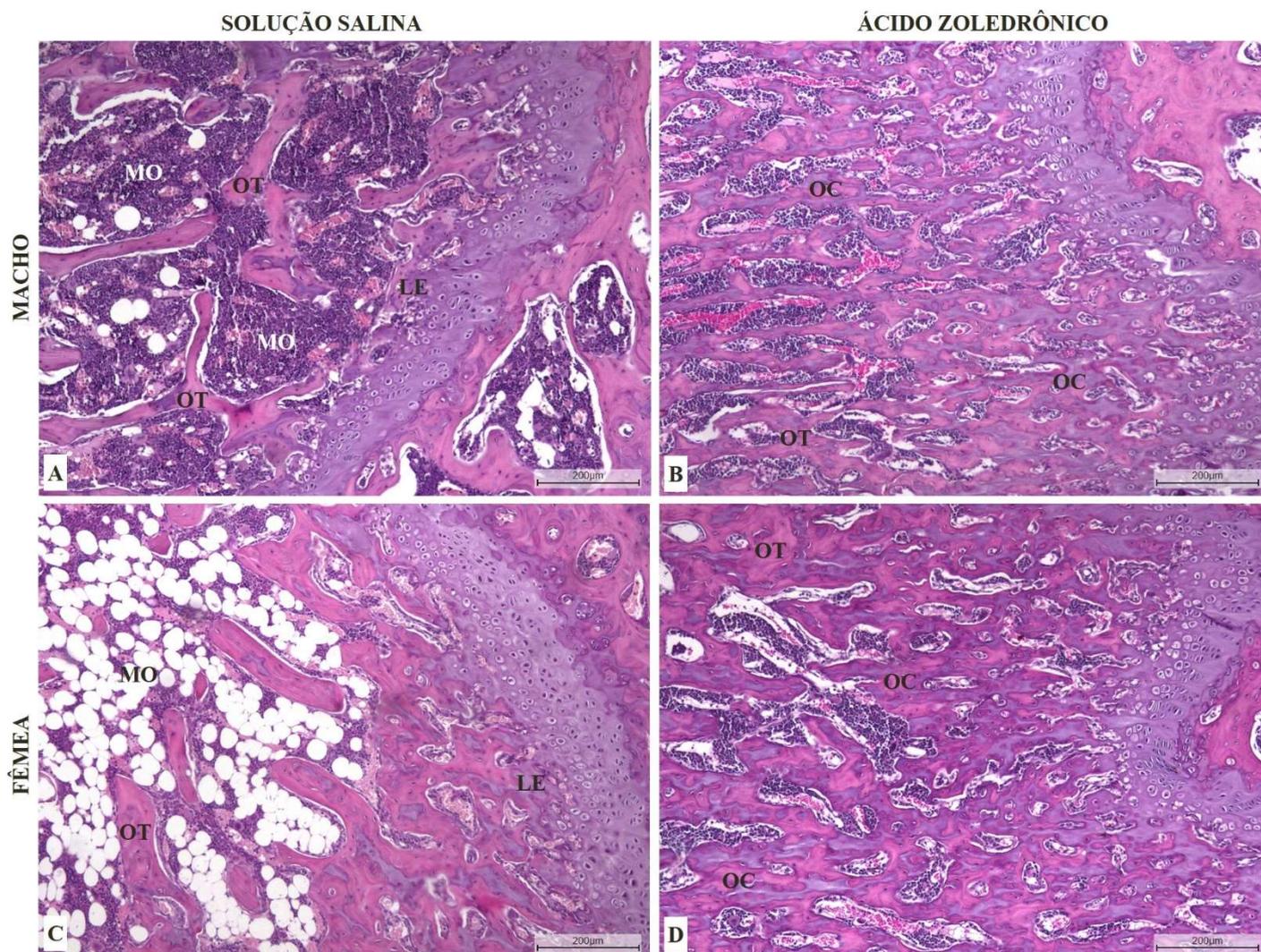
Por outro lado, não houve influência do fator sexo ou da interação entre os fatores estudados nos parâmetros avaliados por histomorfometria ($p>0,05$ em todos os parâmetros) (Tabela 3).

Tabela 3 – Análise histomorfométrica da área de exodontia dos grupos experimentais.

Análise					p-	p-	p-
Histomorfométrica	SALF	AZF	SALM	AZM	Valor ^a	Valor ^b	Valor ^c
% lacunas vazias	10,21±1,37	41,54±5,47	11,57±0,91	32,13±2,90	0,101	0,212	<0,001
% Osteoclastos apoptóticos	2,24±1,45	42,71±2,51	5,95±5,95	53,45±9,73	0,534	0,207	<0,001
Total células inflamatórias	41,00±20,00	205,40±8,45	99,00±18,17	206,67±6,67	0,422	0,403	0,002
Mononucleares	121,50±28,47	201,50±50,54	171,57±50,62	155,20±30,55	0,285	0,966	0,476
Polimorfonucleares	0,00±0,00	54,00±19,00	5,83±3,34	69,50±40,30	0,607	0,267	<0,001

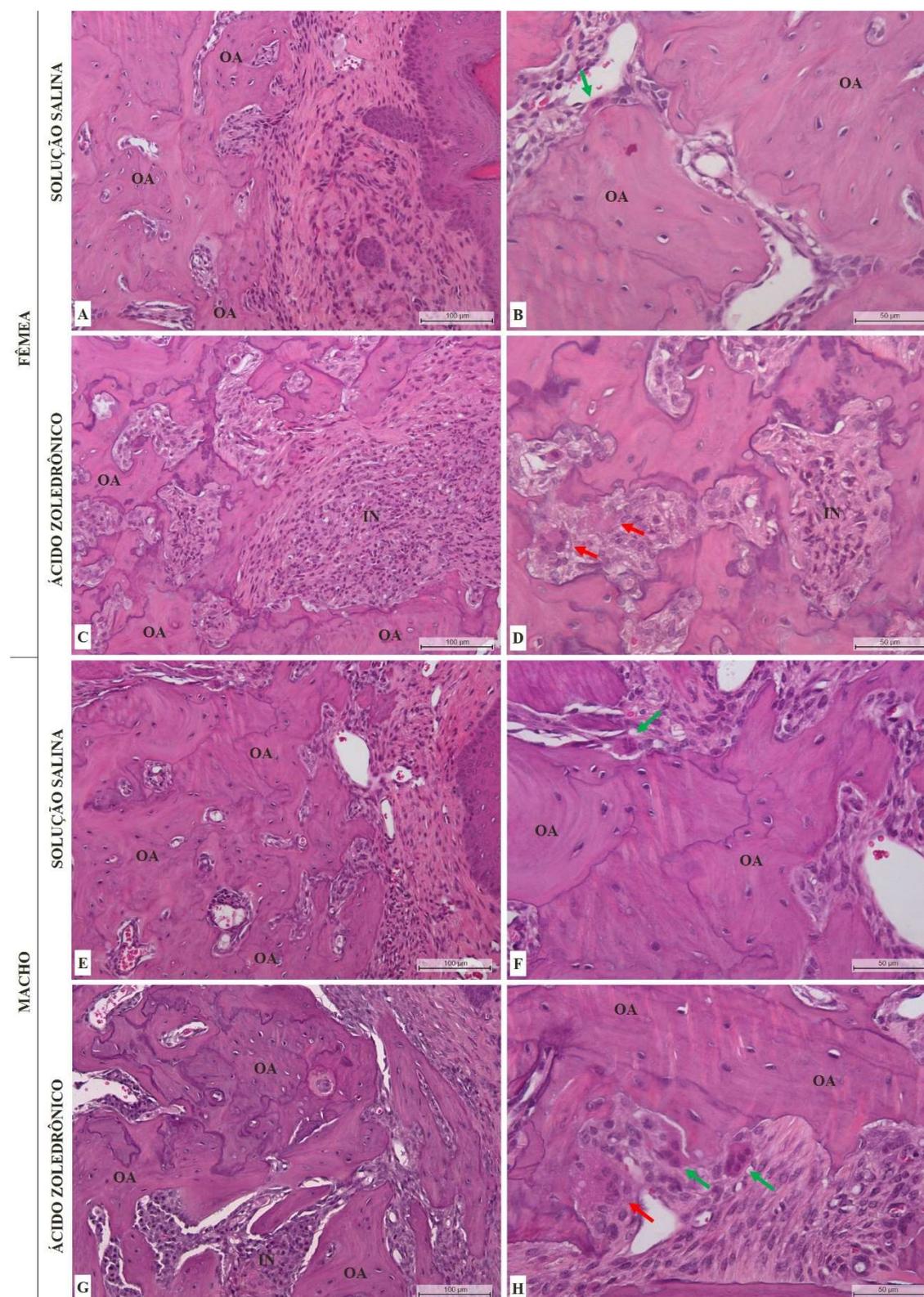
Fonte: dados da pesquisa. Legenda: SALF (camundongos fêmea tratados com solução salina); AZF (camundongos fêmea tratados com AZ); SALM (camundongos machos tratados com solução salina); AZM (camundongos machos tratados com AZ); Teste ANOVA 2-way/Bonferroni; ^ap-Valor da interação; ^bp-Valor do fator sexo; ^cp-Valor do fator tratamento (média ± EPM; n=5-6/grupo).

Figura 7 – Aspecto microscópico da região epifisária femoral.



Fotomicrografias da região epifisária de fêmures dos grupos experimentais, evidenciando linha epifisária (LE) em continuidade com osso lamelar trabecular (OT) nos animais tratados com solução salina (A e C) e um aumento da região osteocondroide (OC) e do trabeculado ósseo nos grupos tratados com AZ (B e D) (HE, 100 x).

Figura 8 – Aspecto microscópico da região de exodontia dos grupos experimentais.



Fotomicrografias da região de exodontia, evidenciando a presença de lacunas de osteócitos vazias no osso alveolar (OA) e de infiltrado inflamatório (IN) nos grupos AZF e AZM (C e G) (HE, 200x), bem como a presença de osteoclastos com sinais histológicos de apoptose (setas vermelhas) (D e H) e viáveis (setas verdes) (H) (HE, 400x). Os grupos SALF e SALM, entretanto, apresentaram trabeculado ósseo com osteócitos viáveis na região de OA, ausência de IN (A e E) (HE, 200x), além de osteoclastos viáveis (setas verdes) (B e F) (HE, 400 x).

Modificações nos parâmetros microtomográficos são observadas em animais tratados com AZ, sendo relação entre volume ósseo e volume tecidual também influenciada pelo sexo.

Na área correspondente ao sítio de exodontia do segundo molar inferior esquerdo, constatou-se que o tratamento com AZ foi responsável pela diminuição significativa da relação entre volume ósseo (VO) e volume tecidual (VT) ($p=0,003$), bem como do número de trabéculas ósseas ($p<0,001$). Por outro lado, tais trabéculas encontravam-se mais separadas nos animais tratados com AZ ($p=0,001$) (Tabela 4).

Vale ressaltar que o fator sexo é influenciador da relação entre VO e VT. Observou-se, portanto, um valor significativamente inferior desse parâmetro nos camundongos fêmeas, quando comparados aos machos ($p=0,016$). Apesar disso, não foram observadas diferenças deste parâmetro na avaliação da interação entre os dois fatores ($p=0,461$), mostrando que os mesmos não apresentaram influência sinérgica (Tabela 4).

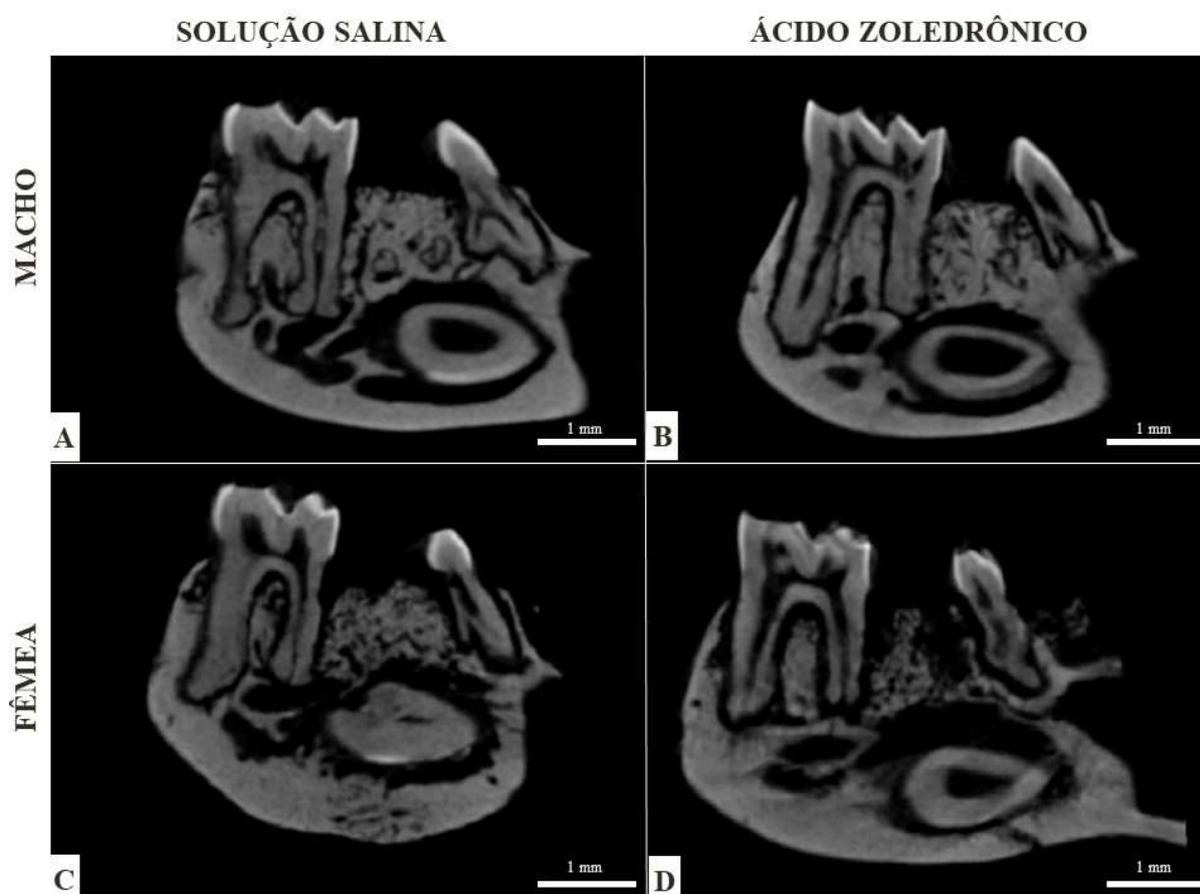
Tabela 4 – Variáveis microtomográficas analisadas em hemimandíbulas esquerdas de camundongos tratados com AZ ou solução salina e submetidos ao procedimento de exodontia.

Parâmetros Microtomográficos	SALF	AZF	SALM	AZM	p- Valor ^a	p- Valor ^b	p- Valor ^c
Densidade mineral óssea	72,26±3,20	72,21±3,25	75,35±0,71	75,82±1,62	0,932	0,189	0,932
VO/VT	73,61±7,84	50,04±5,46	84,41±1,05	69,24±5,57	0,461	0,016	0,003
Espessura trabecular	0,17±0,01	0,20±0,03	0,20±0,01	0,20±0,01	0,550	0,325	0,550
Número de trabéculas	4,33±0,25	3,56±0,13	4,29±0,16	3,38±0,20	0,722	0,586	<0,001
Separação de trabéculas	0,07±0,01	0,13±0,02	0,06±0,00	0,12±0,02	0,890	0,412	0,001

Fonte: dados da pesquisa. Legenda: SALF (camundongos fêmea tratados com solução salina); AZF (camundongos fêmea tratados com AZ); SALM (camundongos machos tratados com solução salina); AZM (camundongos machos tratados com AZ); VO (Volume ósseo da área de interesse); VT (Volume tecidual (área de interesse)). Teste ANOVA 2-way/Bonferroni; ^ap-Valor da interação; ^bp-Valor do fator sexo; ^cp-Valor do fator tratamento (média ± EPM; n=5/grupo).

Imagens microtomográficas representativas dos cortes sagitais avaliados mostraram que as fêmeas apresentavam aparentes diferenças no padrão estrutural ósseo. Além disso, observou-se, mesmo 28 dias após a exodontia, uma pronunciada deficiência de cicatrização da região alveolar nos animais tratados com AZ. (Figura 9)

Figura 9 – Cortes sagitais da região de exodontia (hemimandíbula esquerda) de animais tratados com AZ ou salina.



Cortes sagitais de microtomografia computadorizada evidenciando total cicatrização da área de exodontia dos animais tratados com solução salina (A e C), em contraste com os animais tratados com AZ, os quais apresentaram uma maior região de áreas hipodensas, consistente com deficiência (B) ou ausência de cicatrização (D).

Os fatores sexo e tratamento exercem influência sobre os parâmetros mecânicos do osso femoral de camundongos, de forma independente.

Os fêmures dos animais tratados com AZ apresentaram aumento da área de corte transversal ($p=0,001$), e suportaram, durante os testes, cargas mais elevadas ($p<0,001$). Além disso, o momento de inércia mostrou-se elevado ($p<0,001$) com o tratamento, e as amostras apresentaram um trabalho total à fratura superior ($p=0,030$). Por outro lado, observou-se uma diminuição do módulo de flexão ($p=0,007$) e da tensão de escoamento ($p=0,038$) dessas amostras submetidas ao teste de flexão de três pontos. Apesar disso, os grupos tratados com AZ apresentaram uma maior rigidez à flexão ($p=0,001$) (Tabela 5).

Além disso, há uma influência nos parâmetros biomecânicos teciduais quando se compara o fator sexo em camundongos. Fêmeas apresentaram uma menor área de secção transversal ($p<0,001$) e, durante os testes de flexão, suportaram cargas inferiores ($p<0,001$). Além disso, o módulo de flexão dos fêmures de camundongos fêmeas também se apresentou superior ($p=0,001$), bem como o momento de inércia ($p<0,001$) e o trabalho total à fratura ($p<0,001$). A tensão de escoamento, por sua vez, mostrou-se superior ($p=0,004$) nos fêmures de fêmeas submetidas ao teste de flexão de três pontos, quando comparados aos dos camundongos machos. No entanto, os fatores sexo e tratamento exercem influência nos parâmetros biomecânicos de forma independente ($^a p\text{-Valor}>0,05$ em todos os parâmetros) (Tabela 5).

Tabela 5 – Parâmetros mecânicos obtidos através do teste de flexão de três pontos em camundongos fêmeas e machos tratados com AZ ou solução salina.

Parâmetros Mecânicos	SALF	AZF	SALM	AZM	p-Valor ^a	p-Valor ^b	p-Valor ^c
Área de secção transversal (diáfise)	1,81±0,04	2,09±0,04	2,21±0,08	2,35±0,04	0,223	<0,001	0,001
Carga máxima (N)	23,24±1,11	28,62±1,23	32,63±1,32	37,12±0,80	0,701	<0,001	<0,001
Carga para escoamento (N)	16,07±1,41	15,63±0,93	15,06±0,74	16,06±1,02	0,484	0,784	0,776
Rigidez à flexão (N/mm)	150,42±12,00	185,02±6,47	143,93±10,27	181,53±10,34	0,881	0,620	0,001
Momento de inércia (mm ⁴)	0,19±0,01	0,25±0,01	0,26±0,02	0,32±0,01	0,892	<0,001	<0,001
Trabalho total à fratura (Nmm)	4,98±0,69	8,46±1,07	11,46±0,73	12,09±0,97	0,126	<0,001	0,030
Tensão máxima (MPa)	106,00±6,15	107,28±5,59	117,58±6,67	113,28±3,91	0,627	0,131	0,793
Tensão de escoamento (MPa)	73,41±7,09	58,95±4,20	54,77±4,19	49,17±3,60	0,350	0,004	0,038
Módulo de flexão (MPa)	2268,20±101,47	1762,52±142,57	1665,42±174,45	1354,73±118,48	0,499	0,001	0,007

Fonte: Dados da pesquisa; Legenda: SALF (camundongos fêmea tratados com solução salina); AZF (camundongos fêmea tratados com AZ); SALM (camundongos machos tratados com solução salina); AZM (camundongos machos tratados com AZ); Teste ANOVA 2-way/Bonferroni; ^ap-Valor da interação; ^bp-Valor do fator sexo; ^cp-Valor do fator tratamento (média ± EPM; n=10-12/grupo).

O tratamento com AZ alterou o parâmetro espectroscópico de cristalinidade em osso cortical e medular de camundongos.

Dentre os parâmetros analisados através da microscopia Raman, houve mudança significativa apenas do parâmetro de cristalinidade, que se mostrou superior nas amostras de osso de camundongos tratados com AZ. Pôde-se observar essa diferença na região de osso cortical femoral ($p=0,048$) e hemimandibular (tanto do lado esquerdo ($p=0,048$) quanto direito ($p<0,001$)) (Tabela 6)

Tabela 6 – Variáveis espectroscópicas em região de osso cortical femoral e hemimandibular

Espectroscopia Raman	SALF	AZF	SALM	AZM	p-Valor ^a	p-Valor ^b	p-Valor ^c
Osso cortical							
Fêmur							
Relação Mineral/Orgânico	2,97±0,17	3,42±0,41	3,11±0,66	3,24±0,38	0,731	0,962	0,526
Cont. monohidrogenofosfato	0,34±0,02	0,31±0,02	0,35±0,06	0,34±0,01	0,647	0,576	0,574
Substituição carbonato tipo B	0,41±0,02	0,37±0,02	0,42±0,05	0,39±0,02	0,915	0,659	0,365
Cristalinidade ($\times 10^{-2}$)	4,82±0,09	5,45±0,29	5,13±0,45	5,16±0,09	0,071	0,960	0,048
Razão hidroxiprolina-prolina	0,99±0,01	0,69±0,29	1,01±0,01	1,00±0,01	0,298	0,241	0,270
Hemimandíbula direita							
Relação Mineral/Orgânico	1,94±0,81	2,35±0,22	2,76±0,23	2,67±0,15	0,502	0,150	0,668
Cont. monohidrogenofosfato	0,34±0,05	0,41±0,04	0,38±0,02	0,37±0,02	0,233	0,990	0,287
Substituição carbonato tipo B	0,40±0,05	0,49±0,03	0,45±0,02	0,45±0,02	0,162	0,999	0,167
Cristalinidade ($\times 10^{-2}$)	4,51±0,26	5,34±0,17	4,95±0,08	5,30±0,34	0,074	0,127	<0,001
Razão hidroxiprolina-prolina	1,02±0,02	1,00±0,01	1,02±0,01	0,98±0,05	0,692	0,725	0,241
Hemimandíbula esquerda							
Relação Mineral/Orgânico	2,46±0,28	2,30±0,30	2,40±0,31	2,82±0,32	0,368	0,469	0,678
Cont. monohidrogenofosfato	0,43±0,04	0,45±0,06	0,44±0,07	0,56±0,04	0,416	0,297	0,222
Substituição carbonato tipo B	0,49±0,03	0,52±0,05	0,50±0,06	0,62±0,04	0,355	0,283	0,173
Cristalinidade ($\times 10^{-2}$)	4,98±0,14	5,38±0,21	5,20±0,76	5,71±0,39	0,815	0,277	0,048
Razão hidroxiprolina-prolina	0,99±0,01	0,99±0,01	0,88±0,03	0,98±0,01	0,796	0,802	0,777

Fonte: Dados da pesquisa; Legenda: SALF (camundongos fêmea tratados com solução salina); AZF (camundongos fêmea tratados com AZ); SALM (camundongos machos tratados com solução salina); AZM (camundongos machos tratados com AZ); Teste ANOVA 2-way/Bonferroni; ^ap-Valor da interação; ^bp-Valor do fator sexo; ^cp-Valor do fator tratamento (média ± EPM; n=4/grupo).

Adicionalmente, o tratamento com AZ também foi responsável por aumentar a cristalinidade óssea na região medular, tanto em hemimandíbulas direitas ($p < 0,001$) quanto esquerdas ($p < 0,001$) (Tabela 7).

O fator sexo, por sua vez, não interferiu nos parâmetros espectroscópicos do tecido ósseo, nem tampouco a interação entre os fatores sexo e tratamento ($^a p\text{-Valor} > 0,05$ e $^b p\text{-Valor} > 0,005$ em todos os parâmetros) (Tabelas 6 e 7).

Tabela 7 – Variáveis espectroscópicas em região de osso medular hemimandibular

Espectroscopia Raman	SALF	AZF	SALM	AZM	p-Valor ^a	p-Valor ^b	p-Valor ^c
Osso medular							
Hemimandíbula direita							
Relação Mineral/Orgânico	2,52±0,27	1,90±0,18	2,44±0,40	2,69±0,33	0,234	0,319	0,600
Cont. monohidrogenofosfato	0,38±0,02	1,24±0,71	0,44±0,05	0,38±0,04	0,320	0,376	0,381
Substituição carbonato tipo B	0,44±0,02	0,55±0,04	0,50±0,04	0,46±0,03	0,105	0,615	0,394
Cristalinidade ($\times 10^{-2}$)	4,22±0,26	5,26±0,24	4,63±0,21	5,25±0,00	0,083	0,093	<0,001
Razão hidroxiprolina-prolina	1,01±0,01	0,82±0,16	1,04±0,04	0,98±0,01	0,527	0,391	0,272
Hemimandíbula esquerda							
Relação Mineral/Orgânico	1,81±0,28	1,80±0,19	1,96±0,18	1,96±0,13	0,234	0,319	0,600
Cont. monohidrogenofosfato	0,53±0,09	0,55±0,05	0,52±0,04	0,45±0,06	0,320	0,376	0,381
Substituição carbonato tipo B	0,58±0,08	0,47±0,14	0,56±0,03	0,56±0,04	0,105	0,615	0,394
Cristalinidade ($\times 10^{-2}$)	4,74±0,17	5,38±0,20	4,74±0,19	5,76±0,60	0,074	0,127	<0,001
Razão hidroxiprolina-prolina	0,97±0,00	1,00±0,07	0,99±0,01	0,99±0,01	0,796	0,802	0,777

Fonte: Dados da pesquisa; Legenda: SALF (camundongos fêmea tratados com solução salina); AZF (camundongos fêmea tratados com AZ); SALM (camundongos machos tratados com solução salina); AZM (camundongos machos tratados com AZ); Teste ANOVA 2-way/Bonferroni; ^ap-Valor da interação; ^bp-Valor do fator sexo; ^cp-Valor do fator tratamento (média ± EPM; n=4/grupo).

O tratamento com AZ modifica o parâmetro de cristalinidade da estrutura dental.

Dentre os parâmetros espectroscópicos estudados na estrutura dental, observou-se que apenas a cristalinidade se apresentou significativamente superior nos animais tratados com AZ, em região de esmalte ($p < 0,001$), dentina coronária ($p < 0,001$) e radicular ($p < 0,001$) (Tabela 8).

Ademais, constatou-se que em dentina radicular o fator sexo ($p = 0,019$) e o fator interação ($p < 0,001$) influenciaram no parâmetro de cristalinidade, o qual apresentou-se significativamente superior em fêmeas, sobretudo tratadas com AZ (Tabela 8).

Apesar de não haver influência dos fatores tratamento ($p=0,179$) e sexo ($p=0,071$) de forma independente, a interação entre os dois fatores foi responsável pela diminuição significativa da razão hidroxiprolina-prolina nas fêmeas tratadas com AZ ($p=0,015$) (Tabela 8).

Tabela 8 – Variáveis espectroscópicas do dente (esmalte, dentina coronária e dentina radicular).

Espectroscopia Raman	SALF	AZF	SALM	AZM	p-Valor ^a	p-Valor ^b	p-Valor ^c
Dente							
Esmalte							
Cont. monohidrogenofosfato	0,24±0,04	0,31±0,04	0,19±0,04	0,22±0,02	0,484	0,073	0,171
Substituição carbonato tipo B	0,25±0,04	0,34±0,04	0,29±0,03	0,24±0,02	0,074	0,384	0,538
Cristalinidade ($\times 10^{-2}$)	5,85±0,36	6,63±0,08	5,69±0,39	6,25±0,47	0,464	0,083	<0,001
Dentina coronária							
Relação Mineral/Orgânico	2,84±0,34	1,99±0,20	2,35±0,28	2,54±0,37	0,088	0,928	0,270
Cont. monohidrogenofosfato	0,41±0,05	0,53±0,03	0,50±0,06	0,45±0,04	0,081	0,869	0,470
Substituição carbonato tipo B	0,43±0,04	0,54±0,03	0,52±0,06	0,48±0,04	0,091	0,802	0,477
Cristalinidade ($\times 10^{-2}$)	5,04±0,23	5,93±0,19	5,15±0,16	5,93±0,12	0,492	0,455	<0,001
Razão hidroxiprolina-prolina	1,00±0,01	0,96±0,01	0,99±0,01	1,00±0,01	0,015	0,071	0,179
Dentina Radicular							
Relação Mineral/Orgânico	2,58±0,20	2,12±0,24	2,67±0,27	2,41±0,08	0,618	0,357	0,096
Cont. monohidrogenofosfato	0,47±0,03	0,50±0,05	0,45±0,03	0,47±0,02	0,991	0,441	0,566
Substituição carbonato tipo B	0,50±0,03	0,53±0,05	0,47±0,03	0,49±0,02	0,880	0,320	0,376
Cristalinidade ($\times 10^{-2}$)	4,93±0,20	6,02±0,15	5,05±0,00	5,60±0,09	<0,001	0,019	<0,001
Razão hidroxiprolina-prolina	1,02±0,01	0,95±0,01	0,93±0,07	2,49±1,49	0,336	0,388	0,378

Fonte: Dados da pesquisa; Legenda: SALF (camundongos fêmea tratados com solução salina); AZF (camundongos fêmea tratados com AZ); SALM (camundongos machos tratados com solução salina); AZM (camundongos machos tratados com AZ); Teste ANOVA 2-way/Bonferroni; ^ap-Valor da interação; ^bp-Valor do fator sexo; ^cp-Valor do fator tratamento (média ± EPM; n=6/grupo).

8. DISCUSSÃO

A idade, o sexo e o tratamento farmacológico são fatores que sabidamente influenciam no metabolismo ósseo. Parâmetros como a densidade e a geometria óssea podem indiretamente repercutir em variações de tamanho e massa corporal (NIEVES, 2017). No entanto, neste estudo, as alterações induzidas pelo tratamento com AZ, um aminobisfosfonato e potente inibidor do *turnover* ósseo, e as diferenças encontradas entre o sexo dos animais em alguns parâmetros não foram suficientes para repercutir em variações significativas da massa corpórea.

Sabe-se que o tratamento crônico com AZ é associado à ocorrência de OM, no entanto a sua incidência está diretamente associada à duração da terapia com bisfosfonatos, à via de administração e ao tipo de medicamento utilizado. Achados histológicos e histomorfométricos encontrados no presente estudo, como aumento do percentual de lacunas de osteócitos vazias, aumento de osteoclastos apoptóticos, presença de infiltrado inflamatório e eventuais sequestros ósseos refletem a ocorrência de OM e a ação inibitória deste fármaco em sítios que requerem um *turnover* ósseo aumentado, dados corroborados por outros autores (KUROSHIMA et al., 2014; SCOLETTA et al., 2013; SILVA et al., 2015; SONIS et al., 2009).

Mesmo 28 dias após a realização do procedimento cirúrgico, o tratamento com AZ em doses elevadas (1,0 mg/kg) foi responsável pelo atraso cicatricial dos alvéolos dentários e pela ocorrência de OM, sob aspectos histológicos, histomorfométricos e microtomográficos.

Achados histomorfométricos e microtomográficos em modelo de exodontia de animais tratados com alendronato (outro fármaco aminobisfosfonato), por exemplo, realizado por Hikita e colaboradores em 2009, revelaram deficiência de cicatrização dos alvéolos apenas no sétimo dia pós operatório, enquanto que, após 10 e 14 dias da exodontia, não houve modificações significativas destes parâmetros ou ocorrência de OM (HIKITA et al., 2009).

Outro estudo executado por Lim e colaboradores em 2016, no entanto, constatou, após quatro semanas, uma nítida alteração de parâmetros microtomográficos de sítios de exodontia em ratas tratadas com AZ (diminuição da razão VO/VT, densidade mineral óssea e padrão trabecular), por via intravenosa, mesmo em uso de uma dose inferior (LIM et al., 2016).

Observou-se, no entanto, através da microTC, alterações na razão VO/VT induzida pelo sexo dos animais, de forma independente à influência do tratamento, corroborando com o já reportado na literatura, de que há diferenças na microarquitetura óssea de acordo com o sexo (POPP et al., 2019; NIEVES, 2017; POPP et al., 2017; WILLINGHAM et al., 2010; ECKSTEIN et al., 2007)

Eckstein e colaboradores, em 2017, mostraram que alterações na fração de volume do osso trabecular (VO/VT) dependentes do sexo de fato existem, mas variam ainda de acordo com o sítio anatômico avaliado. Mulheres apresentam valores inferiores desse parâmetro em região distal de rádio, colo e trocânter femoral. No entanto, o estudo não avaliou a região mandibular (ECKSTEIN et al., 2007).

A análise histológica na região epifisária dos fêmures de animais tratados com AZ mostrou alterações na região de osso esponjoso, o qual apresentou uma maior área de trabeculado e presença de tecido osteocondroide. Tal alteração no padrão do trabeculado ósseo pode ser explicada pela ação do fármaco frente à extensa duração do protocolo, uma vez que os animais se encontravam em fase de crescimento.

O tratamento com AZ afetou o processo de remodelação óssea, fisiologicamente inerente e concomitante com o processo de ossificação endocondral que ocorre durante o crescimento de ossos longos. Apesar de o tratamento com AZ não necessariamente prejudicar o crescimento ósseo, nota-se um aumento do trabeculado e da área de secção transversal de fêmures, em nível de osso cortical e medular. Tais alterações não estão associadas à placa epifisária de crescimento. Aminobisfosfonatos, apesar de diminuírem o comprimento da coluna de condrócitos hipertróficos, não induzem a apoptose dessas células. A principal ação desses fármacos no padrão histomorfológico de ossos longos, por conseguinte, reside na diminuição de osteoclastos metafisários (ZHU et al., 2014).

Infere-se, portanto, que as mudanças observadas histologicamente, mesmo em região de epífise, tenham associação com as alterações biomecânicas do osso femoral. No presente estudo, a avaliação desses parâmetros mostrou que os animais tratados com AZ apresentaram, em geral, respostas positivas ao teste de flexão de três pontos. A redução no módulo de flexão e na tensão de escoamento do osso tratado com AZ, mesmo com aumento da cristalinidade, pode ser explicada pela organização estrutural e conformação dimensional do osso, que é um material anisotrópico.

Um estudo prévio demonstrou que a terapia crônica com AZ em camundongos, com doses variando de 0,5 a 1,0 mg/kg, além fornecer impactos na remodelação óssea por interferência em linhagens de células osteoblásticas e osteoclásticas, altera a morfologia do osso cortical e trabecular, bem como suas propriedades biomecânicas. Camundongos tratados com AZ apresentaram um aumento da espessura cortical óssea, associada a um aumento da rigidez à flexão e do momento de inércia, na maior dose administrada, corroborando com os achados do presente estudo (POZZI et al., 2009).

Outro estudo realizado em camundongos revelou que o tratamento crônico com AZ diminuiu a resistência e o módulo de flexão em comparação ao grupo controle, apesar de aumentar a rigidez à flexão. O autor relata que uma das limitações do estudo foi a realização apenas em fêmeas, visto que podem haver respostas diferentes a depender do sexo do animal (BARTLOW et al., 2018).

Os parâmetros mecânicos do presente estudo foram avaliados tanto em machos quanto em fêmeas, e constatou-se que o sexo e o tratamento exercem, de fato, influência em tais parâmetros, mas de forma independente.

Um estudo prévio realizado em camundongos avaliou a influência do sexo nos parâmetros biomecânicos ósseos de diferentes sítios, mostrando que não apenas o sexo, mas a idade dos animais influencia nesses aspectos de forma independente e, por vezes, associada, com resultados semelhantes aos do presente estudo (WILLINGHAM et al., 2010).

Dentre as características espectroscópicas avaliadas em tecido ósseo, apenas a cristalinidade apresentou modificações em animais tratados com AZ. Não houve, por conseguinte, diferenças associadas ao sexo dos animais.

O tratamento com AZ promoveu um aumento da cristalinidade no tecido ósseo, tanto em região cortical quanto em região medular. A realização da exodontia não repercutiu, portanto, na modificação desses parâmetros.

A cristalinidade reflete o tamanho e a organização estequiométrica dos cristais de hidroxiapatita. Já é bem estabelecido que a quantidade de matriz mineral determina a rigidez óssea. No entanto, aspectos estruturais dos cristais de hidroxiapatita parecem, também, influenciar na biomecânica tecidual (GEISLER; BAJAJ; J. CHRISTOPHER FRITTON, 2015; COLE; VAN DER MEULEN, 2011).

A literatura sugere que o tamanho da estrutura cristalina interfere no reforço mecânico das redes de colágeno e, direta ou indiretamente, nos parâmetros de resistência óssea

(YERRAMSHETTY; AKKUS, 2008). Infere-se, portanto, baseado nos achados do presente estudo, que o aumento da cristalinidade provocado pelo tratamento crônico com AZ está associado, junto às modificações estruturais do osso femoral, a melhorias das propriedades biomecânicas teciduais.

Estudos envolvendo biofluidos, sobretudo salivares, têm ganhado cada vez mais respaldo na comunidade científica visto que são excelentes ferramentas de diagnóstico e monitoramento de doenças (através do estudo de biomarcadores), além de exercer importância nos estudos de farmacodinâmica medicamentosa. O transporte de substâncias presentes no soro para a saliva se dá por meio de transporte ativo ou difusão passiva por diferenças no gradiente de concentração. Evidentemente, a presença de uma substância farmacológica na saliva dependerá de uma série de fatores, como as características físico-químicas da substância, a interação com glândulas salivares, estabilidade e possíveis alterações a depender do pH salivar, além da dose administrada e do tempo de uso (NUNES; MUSSAVIRA; BINDHU, 2015; LIU; DUAN, 2012).

A possível presença de AZ na saliva explicaria as alterações na cristalinidade da estrutura do esmalte devido à sua alta afinidade por cristais de hidroxiapatita, apesar da estrutura dental não obedecer aos padrões metabólicos do tecido ósseo.

Estudos *in vitro* de incorporação de AZ em substratos de hidroxiapatita evidenciaram consequentes modificações nos parâmetros espectroscópicos desses substratos (JUILLARD et al., 2010). Infere-se, portanto, que mesmo em baixas concentrações, a provável presença de AZ em saliva justificaria uma incorporação ao esmalte dental. No entanto, são necessários mais estudos para elucidar a presença e concentração de bisfosfonatos em fluidos salivares, bem como sua repercussão na estrutura do esmalte dental.

O tratamento com AZ também elevou a cristalinidade nas regiões de dentina coronária e radicular dos segundos molares inferiores analisados. Vale ressaltar que esses espécimes, antes da exodontia, já se encontravam em fase pós-eruptiva.

Diferentemente do tecido ósseo, a dentina não sofre remodelação, nem tampouco participa da homeostase de cálcio e fosfato. No entanto, linhagens de células odontoblásticas, bem como células dos tecidos dentais (mesenquimais e epiteliais) de ratos neonatos, expressam o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANKL) e osteoprotegerina (OPG), importantes reguladores do metabolismo ósseo, o que demonstra a similaridade dos tecidos ósseo e dental na formação de uma matriz extracelular que

posteriormente será mineralizada (OPSAHL VITAL et al., 2012; RANI; MACDOUGALL, 2000). Dessa forma, sabendo que, mesmo após a erupção dentária, ainda ocorre o processo de mineralização de pré-dentina e formação de dentina secundária (TJÄDERHANE, 2018; CARUSO et al., 2016; BOSKEY, 2007), o tratamento com AZ poderia, indiretamente, induzir alterações na matriz mineralizada do tecido dentinário.

Observou-se, ainda, a influência da interação entre os fatores analisados (sexo e tratamento) na razão hidroxiprolina-prolina de dentina coronária, mostrando que as fêmeas tratadas com AZ tiveram uma redução deste parâmetro.

Diferente da cristalinidade, essa razão avalia modificações pós-translacionais da estrutura de colágeno e sua estabilidade intracadeias, o que poderia refletir também no padrão de mineralização (BUCKLEY et al., 2012). Um estudo prévio demonstrou que doses elevadas de AZ culminaram na diminuição desse fator em tecido ósseo neoformado de ratos, o que levaria a uma menor estabilidade da matriz de colágeno (OLEJNIK et al., 2016).

Em resumo, o tratamento crônico com AZ promoveu alterações histológicas na estrutura epifisária femoral, bem como alterações microscópicas e histomorfométricas em sítios de exodontia. Adicionam-se modificações nos parâmetros microtomográficos, sendo a relação entre volume ósseo e volume tecidual influenciada pelo sexo. Em relação aos aspectos mecânicos, ressalta-se que o sexo dos animais e o tratamento exerceram influência sobre estes parâmetros no osso femoral de camundongos, de forma independente. Finalmente, observou-se que há alteração do padrão de cristalinidade em osso cortical e medular de camundongos, e na estrutura dental.

Diante dessas alterações, principalmente, as biomecânicas e as espectroscópicas, encontradas em tecido ósseo e dentário oriundas do tratamento com AZ, suscita-se a necessidade de determinar a concentração de bisfosfonatos acumulado em tecidos mineralizados (osso e dente) e a possível relação, especialmente nos tecidos dentais, no estabelecimento da OM.

Até onde se sabe, não existem outros relatos na literatura avaliando o efeito do tratamento com bisfosfonatos na estrutura dentária, nem tampouco a provável influência do sexo nesses achados, sendo este o primeiro estudo a realizar essa avaliação.

9. CONCLUSÃO

O tratamento crônico com AZ induz alterações morfológicas e melhorias nas propriedades mecânicas na região de osso femoral. No entanto, as fêmeas apresentam diferenças em tais propriedades, quando comparadas aos machos, além de possuírem uma arquitetura óssea trabecular menos densa na região de alvéolo dentário pós-exodontia.

O tratamento crônico com AZ, apesar de estar associado à ocorrência de OM, promove modificações composicionais na matriz mineral osseodentária e contribui para melhorias da biomecânica tecidual.

REFERÊNCIAS

1. AHMAD, I. et al. Pain Management in Metastatic Bone Disease: A Literature Review. **Cureus**, v. 10, n. 9, p. e3286, 2018.
2. AKHTER, M. P. et al. Bone biomechanical properties in LRP5 mutant mice. **Bone**, v. 35, n. 1, p. 162–169, 2004.
3. AKKUS, O.; ADAR, F.; SCHAFFLER, M. B. Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. **Bone**, v. 34, n. 3, p. 443–453, 2004.
4. AL-ASHQAR, M. et al. Atypical Fractures: an issue of concern or a myth? **Injury**, v. 49, n. 3, p. 649–655, 2017.
5. ALLEN, M. R.; RUGGIERO, S. L. Higher Bone Matrix Density Exists in Only a Subset of Patients With Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 67, n. 7, p. 1373–1377, 2009.
6. AREF, M. W. et al. Zoledronate treatment has different effects in mouse strains with contrasting baseline bone mechanical phenotypes. **Osteoporosis International**, v. 27, n. 12, p. 3637–3643, 2016.
7. BARASCH, A. et al. Risk Factors for Osteonecrosis of the Jaws: a Case-Control Study from the CONDOR Dental PBRN. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 4, p. 439–444, 2011.
8. BARTLOW, C. M. et al. PTH(1-34) and Zoledronic Acid have differing longitudinal effects on juvenile mouse Femur strength and morphology. **J Orthop Res.**, v. 35, n. 8, p. 1707–1715, 2018.
9. BEER, F. P. et al. **Mechanics of Materials**. 7th. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2015.
10. BI, X. et al. Prostate Cancer Metastases Alter Bone Mineral and Matrix Composition Independent of Effects on Bone Architecture in Mice A Quantitative Study Using microCT and Raman Spectroscopy. **Bone**, v. 56, n. 2, p. 454–460, 2013.
11. BORROMEO, G. L. et al. A large case-control study reveals a positive association between bisphosphonate use and delayed dental healing and Osteonecrosis of the jaw. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 29, n. 6, p. 1363–1368, 2014.
12. BOSKEY, A. L. Mineralization of Bones and Teeth. **Elements**, v. 3, p. 387–393, 2007.
13. BOUXSEIN, M. L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents

- using micro-computed tomography. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 7, p. 1468–1486, 2010.
14. BOUXSEIN, M. L. et al. Change in Bone Density and Reduction in Fracture Risk: A Meta-Regression of Published Trials. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 33, n. xx, p. 1–11, 2018.
 15. BUCKLEY, K. et al. Raman spectroscopy reveals differences in collagen secondary structure which relate to the levels of mineralisation in bones that have evolved for different functions. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 43, n. 9, p. 1237–1243, 2012.
 16. CARUSO, S. et al. The process of mineralisation in the development of human tooth. **European Journal of Paediatric Dentistry**, v. 17, n. 4, p. 322–326, 2016.
 17. CARVALHO, F. S. R. et al. Physicochemical and rheological characterization of different Carnoy's solutions applied in oral and maxillofacial surgery. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 48, n. 10, p. 1375–1384, 2017.
 18. CARVALHO, F. S. R. et al. Evaluation of different therapeutic Carnoy's formulations on hard human tissues: A Raman microspectroscopy, microhardness, and scanning electron microscopy study. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 46, n. 5, p. 749–758, 2018.
 19. CHANG, Y. T. et al. Effects of osteoporosis and nutrition supplements on structures and nanomechanical properties of bone tissue. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 4, n. 7, p. 1412–1420, 2011.
 20. COLE, J. H.; VAN DER MEULEN, M. C. H. Whole bone mechanics and bone quality. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 469, n. 8, p. 2139–2149, 2011.
 21. CORY, E. et al. Compressive axial mechanical properties of rat bone as functions of bone volume fraction, apparent density and micro-ct based mineral density. **Journal of Biomechanics**, v. 43, n. 5, p. 953–960, 2010.
 22. COXON, F. P. et al. Protein geranylgeranylation is required for osteoclast formation, function, and survival: inhibition by bisphosphonates and GGTI-298. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 15, n. 8, p. 1467–1476, 2000.
 23. CREMERS, S.; PAPAPOULOS, S. Pharmacology of bisphosphonates. **Bone**, v. 49, n. 1, p. 42–49, 2011.
 24. CUKROWSKI, I. et al. Modeling and spectroscopic studies of bisphosphonate-bone interactions. The Raman, NMR and crystallographic investigations of Ca-HEDP

- complexes. **Bone**, v. 41, n. 4, p. 668–678, 2007.
25. CURRA, C. et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw. Introduction of a new modified experimental model. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 308–313, 2016.
 26. DRABKIN, A. et al. Assessment and clinical management of bone disease in adults with eating disorders: a review. **Journal of Eating Disorders**, v. 5, n. 42, p. 1–11, 2017.
 27. ECKSTEIN, F. et al. Sex Differences of Human Trabecular Bone Microstructure in Aging Are Site-Dependent. v. 22, n. 6, 2007.
 28. EZRA, A.; GOLOMB, G. Administration routes and delivery systems of bisphosphonates for the treatment of bone resorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 42, n. 3, p. 175–195, 2000.
 29. FELICE, P. A. et al. Raman spectroscopy delineates radiation-induced injury and partial rescue by amifostine in bone: a murine mandibular model. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 33, n. 3, p. 279–284, 2015.
 30. GEISLER, J. R.; BAJAJ, D.; FRITTON, J. C. American Society of Biomechanics Journal of Biomechanics Award 2013: Cortical bone tissue mechanical quality and biological mechanisms possibly underlying atypical fractures Joseph. **Journal of Biomechanics**, v. 48, n. 6, p. 883–894, 2015.
 31. GRAHAM, R.; RUSSELL, G. Bisphosphonates: Mode of Action and Pharmacology. **Pediatrics**, v. 119, n. 2, p. S150–S162, 2007.
 32. GREEN, J. R. Bisphosphonates : Preclinical Review. **The Oncologist**, v. 9, n. 4, p. 3–13, 2004.
 33. GREEN, J. R.; ROGERS, M. J. Pharmacologic profile of zoledronic acid: A highly potent inhibitor of bone resorption. **Drug Development Research**, v. 55, n. 4, p. 210–224, 2002.
 34. HENNEMAN, Z. J. et al. Bisphosphonate binding affinity as assessed by inhibition of carbonated apatite dissolution in vitro. **J Biomed Mater Res A**, v. 85, n. 4, p. 993–1000, 2008.
 35. HEYMANN, D. et al. Bisphosphonates: New therapeutic agents for the treatment of bone tumors. **Trends in Molecular Medicine**, v. 10, n. 7, p. 337–343, 2004.
 36. HIKITA, H. et al. Bisphosphonate administration prior to tooth extraction delays initial healing of the extraction socket in rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 27, n. 6, p. 663–672, 2009.

37. HOFSTETTER, B. et al. Effects of alendronate and risedronate on bone material properties in actively forming trabecular bone surfaces. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, n. 5, p. 995–1003, 2012.
38. HOFSTETTER, B. et al. Bone quality of the newest bone formed after two years of teriparatide therapy in patients who were previously treatment-naïve or on long-term alendronate therapy. **Osteoporosis International**, v. 25, n. 12, p. 2709–2719, 2014.
39. HOGBERG, U. et al. Metabolic bone disease risk factors strongly contributing to long bone and rib fractures during early infancy: A population register study. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, p. 1–15, 2018.
40. HOKUGO, A. et al. Equilibrium-dependent bisphosphonate interaction with crystalline bone mineral explains the pharmacokinetics and osteonecrosis of the jaw in rats. **Bone**, v. 53, n. 1, p. 59–68, 2013.
41. HORNBY, S. B. et al. Long-term zoledronic acid treatment increases bone structure and mechanical strength of long bones of ovariectomized adult rats. **Calcified Tissue International**, v. 72, n. 4, p. 519–527, 2003.
42. INFANTE, M. et al. RANKL/RANK/OPG system beyond bone remodeling: involvement in breast cancer and clinical perspectives. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 12, p. 1–18, 2019.
43. JÄMSÄ, T. et al. Comparison of three-point bending test and peripheral quantitative computed tomography analysis in the evaluation of the strength of mouse femur and tibia. **Bone**, v. 23, n. 2, p. 155–161, 1998.
44. JUILLARD, A. et al. Molecular interactions between zoledronic acid and bone: An in vitro Raman microspectroscopic study. **Bone**, v. 47, n. 5, p. 895–904, 2010.
45. JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo:Santos, 1983.
46. KOKORELIS, C. et al. Effects of drugs on bone metabolism in a cohort of individuals with traumatic spinal cord injury. **Spinal Cord Series and Cases**, v. 5, n. 3, p. 1–3, 2019.
47. 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, n. 1, p. 117–23, 2014.
48. KUROSHIMA, S. et al. Distinctive Tooth-Extraction Socket Healing: Bisphosphonate Versus Parathyroid Hormone Therapy. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 1, p. 24–33, 2014.

49. LIM, S. S. et al. Differential modulation of zoledronate and etidronate in osseous healing of an extracted socket and tibia defect. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 123, n. 1, p. 8–19, 2016.
50. LISBOA, M. R. P. et al. Effects of Electroacupuncture on Experimental Periodontitis in Rats. **Journal of Periodontology**, v. 86, n. 6, p. 801–811, 2015.
51. LIU, J.; DUAN, Y. Saliva: A potential media for disease diagnostics and monitoring. **Oral Oncology**, v. 48, n. 7, p. 569–577, 2012.
52. LLOYD, A. A. et al. Atypical fracture with long-term bisphosphonate therapy is associated with altered cortical composition and reduced fracture resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 33, p. 8722–8727, 2017.
53. MANDAIR, G. S.; MORRIS, M. D. Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength. **BoneKEy reports**, v. 4, n. August 2014, p. 620, 2015.
54. MHASKAR, R. et al. Bisphosphonates in multiple myeloma: an updated network meta-analysis (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 12, 2017.
55. MOZZATI, M.; ARATA, V.; GALLESIO, G. Tooth extraction in patients on zoledronic acid therapy. **Oral Oncology**, v. 48, n. 9, p. 817–821, 2012.
56. NEWMAN, C. L. et al. Cortical bone mechanical properties are altered in an animal model of progressive chronic kidney disease. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1–8, 2014.
57. NIEVES, J. W. Sex-Differences in Skeletal Growth and Aging. **Current Osteoporosis Reports**, v. 15, n. 2, p. 70–75, 2017.
58. NUNES, L. A. S.; MUSSAVIRA, S.; BINDHU, O. S. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: A systematic review. **Biochemia Medica**, v. 25, n. 2, p. 177–192, 2015.
59. OLEJNIK, C. et al. Molecular alterations of bone quality in sequesters of bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaws. **Osteoporosis International**, v. 25, n. 2, p. 747–756, 2014.
60. OLEJNIK, C. et al. Doses effects of zoledronic acid on mineral apatite and collagen quality of newly-formed bone in the rat's calvaria defect. **Bone**, v. 89, p. 32–39, 2016.
61. OPSAHL VITAL, S. et al. Tooth dentin defects reflect genetic disorders affecting bone mineralization. **Bone**, v. 50, n. 4, p. 989–997, 2012.
62. OWEN, R.; REILLY, G. C. In vitro Models of Bone Remodelling and Associated Disorders. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, n. 134, p. 1–22,

- 2018.
63. PASCHALIS, E. P.; GAMSJAEGER, S.; KLAUSHOFER, K. Vibrational spectroscopic techniques to assess bone quality. **Osteoporosis International**, p. 1–17, 2017.
 64. PASTERIS, J. D. et al. Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: Implications for bone and biomaterials. **Biomaterials**, v. 25, n. 2, p. 229–238, 2004.
 65. PASTERIS, J. D.; WOPENKA, B.; VALSAMI-JONES, E. Bone and tooth mineralization: Why apatite? **Elements**, v. 4, n. 2, p. 97–104, 2008.
 66. POPP, K. L. et al. Bone mass, microarchitecture and strength are influenced by race/ethnicity in young adult men and women. **Bone**, v. 103, p. 200–208, 2017.
 67. POPP, K. L. et al. Trabecular microstructure is influenced by race and sex in Black and White young adults. **Osteoporosis International**, v. 30, n. 1, p. 201–209, 2019.
 68. POZZI, S. et al. High-dose zoledronic acid impacts bone remodeling with effects on osteoblastic lineage and bone mechanical properties. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 18, p. 5829–5839, 2009.
 69. RANI, C. S. S.; MACDOUGALL, M. Dental cells express factors that regulate bone resorption. **Molecular Cell Biology Research Communications**, v. 3, n. 3, p. 145–152, 2000.
 70. REY, C. et al. Bone mineral: update on chemical composition and structure. **Osteoporosis International**, v. 20, n. 6, p. 1013–1021, 2010.
 71. ROGERS, M. J. et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Cancer**, v. 88, n. 12 Suppl, p. 2961–78, 2000.
 72. RUGGIERO, S. L. et al. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw—2014 Update. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 72, n. 10, p. 1938–1956, 2014.
 73. SANDERSON, J. et al. Clinical effectiveness of bisphosphonates for the prevention of fragility fractures: A systematic review and network meta-analysis. **Bone**, v. 89, p. 52–58, 2016.
 74. SCOLETTA, M. et al. Tooth extractions in intravenous bisphosphonate-treated patients: A refined protocol. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 71, n. 6, p. 994–999, 2013.
 75. SHANE, E. et al. Atypical Subtrochanteric and Diaphyseal Femoral American Society for Bone and Mineral Research. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 29, n. 1, p. 1–23, 2014.

76. SHARAWAT, I. K.; DAWMAN, L. Bone mineral density and its correlation with vitamin D status in healthy school-going children of Western India. **Archives of Osteoporosis**, v. 14, n. 13, p. 9–14, 2019.
77. SILVA, P. G. DE B. et al. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 9, p. 1237–1245, 2015.
78. SILVA, P. G. DE B. et al. Immune cell profile of dental pulp tissue treated with zoledronic acid. **International Endodontic Journal**, v. 50, n. 11, p. 1067–1076, 2016.
79. SILVA, P. G. DE B. et al. Chronic treatment with zoledronic acid alters the expression levels of inflammatory, bone and apoptotic markers and toll-like receptors 2 and 4 in rat dental pulp. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, 2019.
80. SILVERMAN, S. L.; LANDESBURG, R. Osteonecrosis of the Jaw and the Role of Bisphosphonates: A Critical Review. **American Journal of Medicine**, v. 122, n. 2A, p. S33–S45, 2009.
81. 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 Oncology**, v. 45, n. 2, p. 164–172, 2009.
82. SOUNDIA, A. et al. Osteonecrosis of the Jaws (ONJ) in Mice after Extraction of Teeth with Periradicular Disease. **Bone**, v. 90, p. 133–141, 2016.
83. SZULC, P. Bone turnover: Biology and assessment tools. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 32, n. 5, p. 725–738, 2018.
84. TJÄDERHANE, L. Dentin Basic Structure, Composition, and Function. In: **The Root Canal Anatomy in Permanent Dentition**. [s.l.] Springer, Cham, 2018. p. 17–27.
85. TSAO, C. et al. Oral health risk factors for bisphosphonate-associated jaw osteonecrosis. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 71, n. 8, p. 1360–1366, 2013.
86. VAHTSEVANOS, K. et al. Longitudinal cohort study of risk factors in cancer patients of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 32, p. 5356–5362, 2009.
87. WEISS, H. et al. Biodistribution and plasma protein binding of zoledronic acid. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, n. 10, p. 2043–2049, 2008.

88. WILLINGHAM, M. D. et al. Age-Related Changes in Bone Structure and Strength in Female and Male BALB/c Mice. **Calcif Tissue Int**, v. 86, n. 6, p. 470–483, 2010.
89. WOO, S.; HELLSTEIN, J. W.; KALMAR, J. R. Systematic Review: Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaws. **Annals of Internal Medicine**, v. 144, n. 10, p. 753–61, 2006.
90. YERRAMSHETTY, J. S.; AKKUS, O. The associations between mineral crystallinity and the mechanical properties of human cortical bone. **Bone**, v. 42, n. 3, p. 476–482, 2008.
91. ZHU, E. D. et al. Effect of bisphosphonates on the rapidly growing male murine skeleton. **Endocrinology**, v. 155, n. 4, p. 1188–1196, 2014.

ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



Universidade Federal do Ceará
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
 Cep: 60430270 Fortaleza – CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E ESTRUTURAL DO TECIDO OSSEODENTÁRIO TRATADO COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO: ESTUDO IN VITRO E IN VIVO”, protocolo N°89/17, sob responsabilidade da Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves que envolve a produção, manutenção e/ou utilização, pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de nº 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião no dia 17 de agosto de 2017.

Vigência do projeto	17/09/2017 a 17/09/2018
Espécie/Linhagem	Camundongo Heterogênico Swiss
Nº de Animais	96
Peso	20-30g
Sexo	48-Machos e 48-Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 18 de agosto de 2017

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
 Coordenador do CEUA UFC