

**UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Liliane Cristine Ferreira de Souza Borges

**AVALIAÇÃO DO COMPLEXO MAXILO-MANDIBULAR DE
RATOS TRATADOS COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO**

**Sorocaba/SP
2013**

Liliane Cristine Ferreira de Souza Borges

**AVALIAÇÃO DO COMPLEXO MAXILO-MANDIBULAR DE
RATOS TRATADOS COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marco Vinicius Chaud

**Sorocaba/SP
2013**

Liliane Cristine Ferreira de Souza Borges

**AVALIAÇÃO DO COMPLEXO MAXILO-MANDIBULAR DE
RATOS TRATADOS COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em 25/06/2013

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Marco Vinicius Chaud
Universidade de Sorocaba

Profa. Dra. Cristiane de Cássia Bergamaschi Motta
Universidade de Sorocaba

Prof. Dr. Alexandre Brait Landulpho
Universidade Paulista

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação primeiramente a Deus, pela vida e saúde.

Aos meus pais Renê e Janete, por serem fundamentais em minha vida.

Ao meu esposo, amigo e companheiro Raphael que sempre apoia minhas decisões.

As minhas irmãs Juliana e Mariana pelo incentivo e amizade.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Renê e Janete, meus grandes exemplos e incentivadores do meu estudo.

Agradeço ao meu esposo Raphael, por todo carinho, compreensão e apoio.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud, por todo o conhecimento transmitido, pela dedicação e principalmente pela forma acolhedora com que recebeu a minha idéia.

Agradeço a Dra Perla Porto Leite Shitara, pela semente plantada na minha residência em Odontologia Hospitalar, onde temos essa dissertação como fruto.

Agradeço a Equipe de Odontologia Hospitalar/Home Care (Dra Perla, Dra Daiane, Dr Tomio e Márcia) pelo companheirismo, carinho e pelas horas de estudo compartilhadas.

Agradeço a minha querida irmã e colega de trabalho Juliana Ferreira de Souza, por todo apoio .

Agradeço a Valéria de Campos Orsi, coordenadora dos Laboratórios em Saúde (UNISO), pela compreensão e prontidão em ajudar.

Agradeço ao Prof. Dr. Halbert Villalba, patologista oral, pelos conhecimentos transmitidos ao trabalho.

Agradeço as colegas de trabalho Ana Léia e Francisca Joelma pelas horas de laboratório compartilhadas.

Agradeço a Ana Cláudia da Costa Campos e ao Laboratório DB- Diagnósticos Brasil pelo apoio no preparo histológico.

Agradeço a todos os funcionários da Universidade de Sorocaba (UNISO), que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço aos meus familiares e amigos que torcem pelo meu sucesso.

Por fim, agradeço a todos os meus queridos pacientes que são fonte de inspiração para o meu trabalho.

Muito obrigada!

**“Mas é preciso ter manha
É preciso ter graça
É preciso ter sonho, sempre
Quem traz na pele essa marca
Possui a estranha mania
De ter fé na vida ”**

(Milton Nascimento)

RESUMO

Osteoporose é uma doença crônica, degenerativa que afeta grande parcela da população, principalmente as mulheres acima dos 50 anos; com gastos de tratamento e assistência relativamente altos. Os bisfosfonatos (BFs), como inibidores da reabsorção óssea, são utilizados para tratamento da osteoporose desde a década de 60. Este grupo de compostos tem sido utilizado também nos casos de metástase óssea de tumores sólidos, mieloma múltiplo, hipercalcemia e doença de Paget. Diante de diversos casos relatados na literatura de osteonecrose associada aos BFs, a presente pesquisa tem por objetivo investigar a associação de necrose óssea à terapia com ácido zoledrônico e procedimento cirúrgico odontológico (exodontia de molares). O experimento foi realizado *in vivo*, com 18 animais *Rattus norvegicus albinus* da linhagem Wistar, machos, admitidos com aproximadamente 120g. Os animais; foram divididos aleatoriamente em 3 grupos denominados grupos A, B e C. Os animais do grupo A foram submetidos a 3 administrações de ácido zoledrônico (0,6mg/kg) e submetidos a exodontia, o grupo B foram submetidos a 3 administrações do ácido zoledrônico e não foram submetidos a exodontia, o grupo C não foi submetido a administração do ácido zoledrônico e foi submetido a exodontia. Alterações alveolares foram investigadas por meio da análise histológica. Os animais tratados com ácido zoledrônico e submetidos à exodontia apresentaram osteonecrose (60%); os animais submetidos a terapia com ácido zoledrônico apresentaram irritação periorbital (58,3%) e pH da urina básico (91,7%). A presente pesquisa permitiu concluir que o uso de ácido zoledrônico foi fator de risco para o desenvolvimento de osteonecrose principalmente quando o uso está associado à procedimento cirúrgico odontológico.

Palavras-chave: Bisfosfonatos. Osteonecrose. Mandíbula. Maxila. Ácido zoledrônico.

ABSTRACT

Osteoporosis is a chronic, degenerative disease that affects a large portion of the population, especially women over 50 years, with treatment and care costs relatively high. Bisphosphonates (BPs), as inhibitors of bone resorption, are used to treat osteoporosis since the 60s. This group of compounds has also been used in cases of bone metastasis of solid tumors, multiple myeloma, Paget's disease and hypercalcemia. Faced with many reported cases of osteonecrosis associated with BPs, this research aims to investigate the association of bone necrosis to zoledronic acid therapy and dental surgery (extraction of molars). The experiment was performed in vivo, with 18 animals *Rattus norvegicus albinus*, male admitted with approximately 120g. The animals were randomly divided into 3 groups called groups A, B and C. The animals of group A underwent three administrations of zoledronic acid and subjected to dental extraction, group B underwent three administrations of zoledronic acid and were not subjected to dental extraction in group C did not undergo the administration of zoledronic acid and underwent the dental extraction. Alveolar changes were investigated by histologic analysis. Animals treated with BPs and submitted to dental extraction showed osteonecrosis (60%), animals undergoing therapy with zoledrônico acid had eye irritation (58,3%) an urinary pH basic (91,7%). This study concluded that the use of zoledronic acid, is a risk factor for the development of osteonecrosis mainly when if use is associated with dental surgery.

Key-words: Bisphosphonates. Osteonecrosis. Jaw. Zoledronic acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura química dos Bisfosfonatos	16
Quadro 1	Estágios da Osteonecrose	22
Quadro 2	Fatores de risco para o desenvolvimento da osteonecrose	24
Figura 2	Administração do medicamento	28
Figura 3	Ácido Zoledrônico (Zometa®)	28
Figura 4	Radiografias periapicais	29
Figura 5	Abertura da cavidade oral	30
Figura 6	Instrumentais utilizados	30
Figura 7	Elemento dental removido	31
Figura 8	Fragmento da maxila	32
Figura 9	Fragmento da maxila	32
Figura 10	Irritação ocular em animais tratados com ácido zoledrônico	37
Figura 11	Inflamação periorbital	37
Figura 12	Alteração do pH da urina após a administração medicamentosa	38
Figura 13	Corte histológico da região do molar	39
Figura 14	Corte histológico da região pós exodontia	39
Figura 15	Corte histológico de estrutura dentária	40
Figura 16	Corte histológico do tecido ósseo	40
Figura 17	Análise descritiva histológica	41

LISTA DE ABREVIATURAS

AAOMS: American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons

BFs: Bisfosfonatos

BFsIV: Bisfosfonatos intravenoso

C: Carbono

Ctx: Telopectídeo carboxiterminal do colágeno tipo I

D: Direita

Daly: Índice de qualidade de vida

DMO: Densidade Mineral Óssea

E: Esquerda

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetracético

g: Gramas

HNO₃: Ácido Nítrico

KOH: Hidróxido de Pótássio

m: Massa

MSRE: Moduladores seletivos dos receptores estrógeno

OMS: Organização Mundial de Saúde

P: Fósforo

SUS: Sistema Único de Saúde

UNISO : Universidade de Sorocaba

v: Volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Osteoporose	14
2.2 Bisfosfonatos e Mecanismos de Ação	16
2.3 Indicações Clínicas para a Terapia com Bisfosfonatos	18
2.4 Glicocorticóides e o risco de osteonecrose	20
2.5 Osteonecrose induzida por Bisfosfonatos	21
2.6 Tratamentos da Osteonecrose	25
3 OBJETIVO	26
4 MATERIAL E MÉTODO	27
4.1 Aspectos éticos	27
4.2 Caracterização dos grupos de animais	27
4.3 Manutenção e manipulação dos animais	27
4.4 Administração do Fármaco	28
4.5 Obtenção de imagens radiológicas	29
4.6 Procedimento Cirúrgico Odontológico (exodontia)	29
4.7 Avaliação Clínica	31
4.8 Eutanásia	31
4.9 Preparação das amostras para análise histológica	32
4.10 Análise Histológica	34
4.11 Análise dos Dados	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
5.1 Obtenção de imagens radiológicas	35
5.2 Avaliação Clínica	36
5.3 Resultados do estudo histológico	38
6 CONCLUSÃO	44
7 REFERÊNCIAS	45
ANEXO A - Parecer do Cômite de Ética	51

1 INTRODUÇÃO

Osteoporose é uma doença crônica, degenerativa que afeta grande parcela da população, principalmente as mulheres acima dos 50 anos; e os gastos com o tratamento e assistência no Sistema Único de Saúde (SUS) são relativamente altos.

Clinicamente, a osteoporose é definida como uma doença esquelética sistêmica, caracterizada por redução de massa óssea e deterioração na microarquitetura do tecido ósseo, resultando em aumento da fragilidade óssea e consequente susceptibilidade à fratura.

Os fármacos mais comumente usados no tratamento da osteoporose são os hormônios derivados da paratireoide, o ranelato de estrôncio e os bisfosfonatos (alendronato, ácido zoledrônico, ibandronato, risendronato). Estes fármacos reduzem o risco de fratura vertebral e não vertebral e em alguns casos específicos, o risco de fratura no quadril.

Os bisfosfonatos (BFs), como inibidores da reabsorção óssea, são utilizados para tratamento da osteoporose desde a década de 60, sendo considerados como tratamento de primeira escolha. Não obstante, este grupo de compostos tem sido utilizado, também, nos casos de metástase óssea de tumores sólidos, mieloma múltiplo, hipercalcemia e doença de Paget.

Quimicamente os BFs são análogos sintéticos do pirofosfato inorgânico, e caracterizados por ligações fósforo-carbono-fósforo (P-C-P). A base para a utilização clínica dos BFs é a grande afinidade destes compostos pela apatita óssea, sendo potentes inibidores da reabsorção óssea.

Os BFs são encontrados em formas farmacêuticas para administração oral e parenteral. Embora os mecanismos de ação dos BFs não estejam completamente elucidados, esses compostos afetam o remodelamento ósseo nos níveis: físico-químico, metabólico e celular.

Apesar de todos os benefícios da terapia com BFs, esses fármacos têm sido associados a uma complicação debilitante, que afeta a mandíbula e/ou a maxila, denominada osteonecrose dos maxilares.

Diante de diversos casos relatados na literatura de osteonecrose maxilo-mandibular associada aos BFs, a presente pesquisa teve por objetivo investigar em modelo animal a associação de necrose óssea, terapia com ácido zoledrônico (bisfosfonato da classe dos nitrogenados) e procedimento cirúrgico odontológico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Osteoporose

Osteoporose é uma doença crônica, degenerativa que afeta cerca de 75 milhões de pessoas segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2006). A incidência desta doença aumenta com a idade e está associada a elevados índices de morbidade e mortalidade, prejuízo na qualidade de vida e impacto socioeconômico negativo (GUIA, 2009; PAPAPOULOS, 2011).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Banco Mundial avaliam o impacto socioeconômico de doenças crônicas, através das mortes decorrentes das mesmas, da alteração do estado de saúde bem como das incapacidades provocadas nos sobreviventes (MURRAY; LOPEZ, 1996). Na Europa o custo direto para cerca de 2,7 milhões de fraturas osteoporóticas é de 36 bilhões de Euros (KANIS;JOHNELL, 2000). Os altos custos sociais e pessoais da osteoporose apresentam desafios para a saúde pública e, em particular, aos médicos, pois a maioria dos pacientes com osteoporose permanece sem tratamento (KANIS;BURLET, 2008).

De acordo com a OMS, de 13% a 18% das mulheres e 3% a 6% dos homens, acima de 50 anos, sofrem com a osteoporose. No Brasil, o número de pessoas que possuem a doença chega a 10 milhões e os gastos com o tratamento e assistência no Sistema Único de Saúde (SUS), são relativamente altos. Em 2010, o SUS gastou aproximadamente 81 milhões de reais para a atenção ao paciente portador de osteoporose e vítima de fraturas por quedas (MS, 2011).

A abordagem do impacto sócio econômico, com base na deficiência e anos de vida perdidos (DALY), permite uma comparação com outros estados patológicos. Em estudos apresentados na última década, a osteoporose representou DALYs maior que a artrite reumatoide, hipertensão e doença de Parkinson e menor que a osteoartrite. No que se refere à doenças neoplásicas, o índice DALYs da osteoporose foi maior do que todos os tipos de câncer, exceto o de pulmão (JOHNELL; KANIS, 2006).

Clinicamente, a osteoporose é definida como uma doença esquelética sistêmica, caracterizada por redução de massa óssea e deterioração na microarquitetura do tecido ósseo, resultando em aumento da fragilidade óssea e consequente susceptibilidade à fratura. Como fratura óssea é a consequência mais comum da osteoporose, a prevenção e a inibição da progressão da doença são os principais objetivos das intervenções clínicas. Desta forma, o gerenciamento de pacientes osteoporóticos consiste tanto de intervenção não farmacológica como farmacológica (DELMAS, 2002; RIZZOLI; BONJOUR, 2004; PAPAPOULOS, 2011).

Os fármacos mais comumente usados no tratamento da osteoporose são os BFs (alendronato, ácido zoledrônico, ibandronato, risendronato), os hormônios derivados da paratireoide e o ranelato de estrôncio. Estes fármacos reduzem o risco de fratura vertebral e não vertebral e em alguns casos específicos, o risco de fratura no quadril (DELMAS, 2002; RIZZOLI; BONJOUR, 2004).

O tratamento farmacológico da osteoporose envolve duas abordagens, o estímulo da formação óssea ou a inibição da reabsorção óssea. Os estimuladores da formação óssea, tais como raloxifeno, calcitonin, denosumabe e teripartide são moduladores seletivos dos receptores de estrógeno (MSRE) são agentes não-esteroidais que se ligam ao receptor de estrógeno e dependendo do tecido alvo, agem como agonista ou antagonista de estrógenos. O Raloxifeno é o único MSRE disponível para prevenção e tratamento da osteoporose pós-menopausa. Os inibidores da reabsorção óssea, como os BFs agem sobre os osteoclastos, interferindo diretamente na osteoclastogênese (DELMAS; CALVO, 2002).

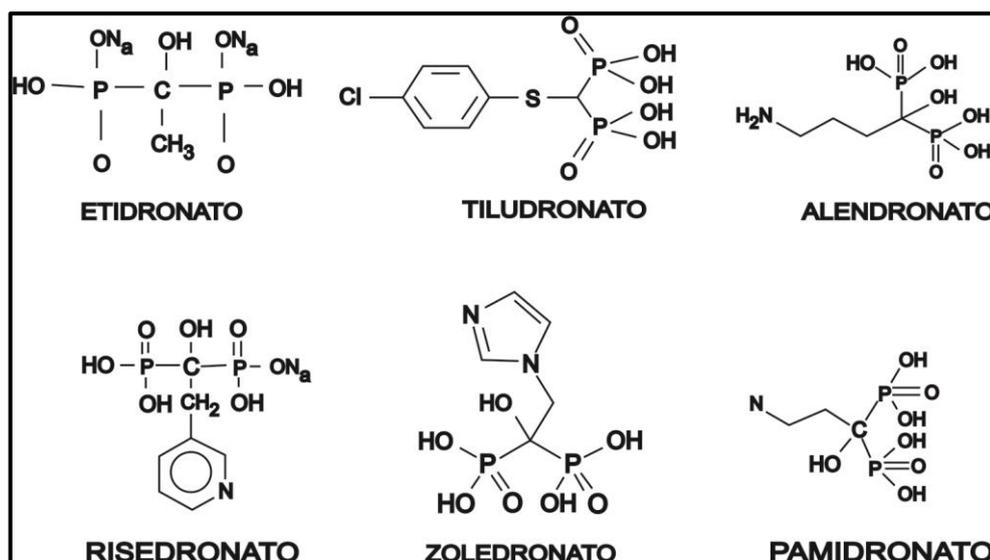
Os BFs, como inibidores da reabsorção óssea, são utilizados para tratamento da osteoporose desde a década de 60 e são considerados como tratamento de primeira escolha. Este grupo de compostos tem sido utilizado, também, nos casos de metástase óssea de tumores sólidos, mieloma múltiplo, hipercalcemia e doença de Paget (NEME; MELO; POMPEI, 2012).

2.2 Bisfosfonatos e Mecanismos de Ação

Os BFs compõem uma classe de substâncias químicas que apresentam ligação fósforo-carbono-fósforo (P-C-P). Estes compostos são utilizados em patologias ósseas como hipercalcemia maligna, doença metastática, osteíte deformante e osteoporose (KANIS; BURLET, 2008).

Os BFs são análogos químicos da substância endógena denominada ácido pirofósforico, que no organismo é encontrada como pirofosfato, um inibidor natural da reabsorção óssea. No pirofosfato o átomo central é o oxigênio. Devido à extensa degradação enzimática, este composto tem vida biológica muito curta, insuficiente para influenciar no metabolismo ósseo. Nos BFs as características biofarmacêuticas são alteradas de acordo com diferentes substituintes (R1 e R2) ligados ao carbono central. A adição de um grupo hidroxila ao átomo de carbono na posição R1 aumenta a potência antirreabsortiva. A atividade farmacológica aumenta com a presença de grupos amina no final da cadeia lateral e com o comprimento da cadeia lateral (Figura 1) (FERNANDES; LEITE; LANÇAS, 2005).

Figura 1- Estrutura química dos Bisfosfonatos



Fonte: Adaptado de FERNANDES, C.; LEITE, R. S.; LANÇAS, F. M. Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. *Química Nova*, v. 28, n.2 p. 274-280, fev, 2005.

Os BFs podem ser divididos em dois subgrupos, dependendo da presença ou não de nitrogênio. Pesquisas recentes sugerem que os primeiros BFs usados clinicamente e não-aminados (etidronato e clodronato) são metabolizados em análogos citotóxicos de ATP23, sendo estes os responsáveis pela inibição da atividade dos osteoclastos. Por outro lado, os BFs aminados, mais novos e potentes (pamidronato, ibandronato, alendronato e ácido zoledrônico) induzem apoptose nos osteoclastos, inibindo enzimas da via do mevalonato e prevenindo a prenilação (principalmente a geranilgeranilação) de pequenas proteínas que se ligam a GTP, que são essenciais para o tráfego de vesículas e manutenção da integridade do citoesqueleto (VANSCONCELLOS; DUARTE; MAIA, 2004; FERNANDES; LEITE; LANÇAS, 2005; VANDOME *et al.*, 2012).

Os BFs apresentam em sua estrutura química dois grupamentos fosfato (PO_3) ligados covalentemente a um carbono central, acrescidos de duas cadeias denominadas genericamente de R1 e R2. A primeira cadeia, curta, é responsável pelas propriedades químicas e farmacocinéticas dos BFs, além de conferir, em conjunto com os grupamentos fosfato, alta afinidade ao tecido ósseo. Já a cadeia longa R2 determina a potência anti-reabsortiva e o mecanismo de ação farmacológico. Contudo, ambas são de grande importância para a efetividade destes medicamentos (CASTRO; FERREIRA; FERREIRA, 2004; JARDIM JUNIOR; SOUZA, 2005).

Os BFs reduzem a extensão das regiões em reabsorção e a profundidade nas áreas erodidas, pois diminuem a atividade clástica; inibindo o recrutamento das células para a superfície óssea, inibindo a atividade celular, induzindo a apoptose e alterando a troca mineral durante o processo de reabsorção óssea (CONSOLARO; CONSOLARO, 2008).

Os BFs apresentam baixa absorção intestinal sendo pouco lipofílicos, ou seja, de difícil transporte por meio da barreira epitelial. Além de serem moléculas relativamente grandes que complexam facilmente com o cálcio, ligam-se preferencialmente a ossos com alta taxa de remodelagem, devido à grande exposição de hidroxapatita nesses sítios, tendo uma pequena fração biodisponível (FERNANDES; LEITE; LANÇAS, 2005).

Aproximadamente 50% da dose administrada ficam acumuladas em locais de mineralização óssea, permanecendo nestes sítios por meses ou anos, até ocorrer à reabsorção. O fármaco quando administrado por via oral, sofre pouca absorção sendo esta ainda afetada pela alimentação, particularmente pelo leite. Uma vez livre no plasma, é excretado em sua forma inalterada, pelo rim, sendo a excreção renal a única rota de eliminação desse medicamento (CARVALHO *et al.*, 2010). A meia-vida plasmática dos BFs é de aproximadamente 10 anos, e seu uso prolongado pode resultar em acúmulo substancial da droga no esqueleto (RUGGIERO; WOO, 2007).

Os BFs reduzem a reabsorção óssea de maneira dose dependente, principalmente ao inibirem o recrutamento e promoverem a apoptose dos osteoclastos, além de estimularem a atividade osteoblástica. Com o decréscimo da atividade osteoclástica, ocorre inibição da liberação de fatores de crescimento e de outros peptídeos da matriz óssea. Inibição semelhante ocorre sobre as células endoteliais. Células tratadas com BFs tiveram decréscimo da proliferação e aumento da taxa de apoptose. Também foram observadas, diminuição da formação de tubos capilares e conseqüente redução do número de vasos sanguíneos (GEGLER *et al.*, 2006). Os BFs afetam o remodelamento ósseo em vários níveis. No nível tecidual, inibem a reabsorção óssea, alterando o remodelamento ósseo, interferindo no grau de formação óssea. Quanto ao nível celular, os BFs alteram os osteoclastos inibindo sua função de diversas maneiras, tais como: inibição do recrutamento e diminuição do tempo de vida dos osteoclastos e inibição da atividade osteoclástica na superfície óssea. No nível molecular tem se evidenciado que os BFs modulam as funções dos osteoclastos pela interação com receptores da superfície celular ou enzima intracelular (MARTINS *et al.*, 2009).

2.3 Indicações Clínicas para a Terapia com Bisfosfonatos

Atualmente, estão disponíveis no mercado BFs de administração parenteral e oral. Os BFs orais são utilizados no tratamento da osteoporose, contudo existem outras indicações menos frequentes como: a Doença de Paget e a Osteogênese Imperfeita. Os BFs intravenosos (BFsIV) estão indicados para o tratamento da

hipercalcemia associada ao mieloma múltiplo e a tumores sólidos com metastização óssea (câncer de mama, próstata e pulmão). Os BFsIV são eficazes na prevenção e redução da hipercalcemia, na estabilização de patologia óssea e na prevenção de fraturas (SCARPA *et al.*, 2010).

A base para a utilização clínica dos BFs é a grande afinidade destes compostos pela apatita óssea. Como potente inibidor da reabsorção óssea, os BFs agem reduzindo a atividade dos osteoclastos e aumentando a apoptose. O mecanismo de ação sobre os osteoclastos incluem inibição do próton vacuolar adenosina trifosfatase (ATPase), alteração do citoesqueleto e das invaginações dos bordos celulares. Os aminobisfosfonatos também inibem várias etapas da via do mevalonato, modificando assim a isoprenilação das proteínas ligadas ao trifosfato de guanosina (KANIS; BURLET, 2008).

Os BFs disponíveis no mercado são: o risedronato, ibandronato, alendronato, pamidronato, ácido zoledrônico e clodronato dissódico. Sintomatologia do tipo gripal, astenia, anemia, sintomatologia gastrointestinal, dispnéia, cefaléia, ansiedade, conjuntivite, visão turva, anorexia, edema, elevação dos níveis de creatinina, insuficiência renal e úlceras esofágicas são algumas das reações adversas descritas para o tratamento com BFs (MIGLIORATI *et al.*, 2005; GEGLER *et al.*, 2006).

Esses fármacos são potentes inibidores da reabsorção óssea mediada por clastos, atuam indiretamente nos osteoblastos, inibindo a reabsorção óssea, alterando a função dos clastos (unidades osteorremodeladoras). São efetivas na redução das concentrações de cálcio no soro de pacientes com hipercalcemia maligna. Além disso, constituem uma nova modalidade de tratamento para metástases ósseas, reduzindo a quantidade e o índice de complicações esqueléticas no mieloma múltiplo e no câncer de mama avançado, bem como aliviam a dor óssea causada por metástases de vários tumores sólidos, com consequente aumento da qualidade de vida do paciente (CASTRO; FERREIRA; FERREIRA, 2004).

Várias pesquisas demonstraram que os BFs também possuem efeito em outras células além dos osteoclastos, incluindo células tumorais. Já existe uma quantidade considerável de dados *in vitro* demonstrando que os BFs têm ação citostática, induzem apoptose e inibem a adesão e a invasividade de células tumorais, interferem no processo metastático; têm efeito na secreção de fatores de

crescimento e citocinas e inibem a angiogênese tumoral. Embora em menor escala, evidências *in vivo* demonstrando a ação dos BFs em tumores estão começando a se acumular (ORTIZ, 2004; CONSOLARO; CONSOLARO, 2008).

2.4 Glicocorticóides e o risco de osteonecrose

A causa secundária mais comum de osteoporose é aquela decorrente do uso oral de glicocorticoides e a principal causa de osteonecrose não traumática (WEINSTEIN *et al.*, 2000; BOUTSEN *et al.*, 2001; WEINSTEIN, 2012). O nome osteonecrose, também conhecido como necrose isquêmica ou avascular, pode ser enganosa, uma vez que não tem sido demonstrado que as células ósseas morrem por necrose. De fato, as respostas inflamatórias e de inchaço das células que caracterizam a necrose em tecido mole usualmente não são observadas nos ossos (MANKIN, 1992).

Os glicocorticóides são utilizados no tratamento de muitas doenças, invariavelmente, o período de tratamento é por um longo tempo. No Reino Unido aproximadamente 250.000 pessoas usam glicocorticoides em tratamento de doenças crônicas, mas poucos são tratados para doenças esqueléticas (KANIS *et al.*, 2007). As indicações mais frequentes do uso de glicocorticóide são nas doenças respiratórias, seguido das doenças musculoesquelética e cutâneas. Esforços para reduzir a dose ou descontinuar a administração deste fármaco não têm sido bem sucedidos, devido principalmente, à necessidade de glicocorticoides em pacientes transplantados (SOCIE *et al.*, 1997), nos tratamentos pulmonares, autoimunes e hematopoiéticos (WEINSTEIN *et al.*, 2000).

Estudos prospectivos e epidemiológicos têm mostrado que os glicocorticoides diminuem a massa óssea e, portanto, aumentam o risco de fraturas em 30 a 50% (EASTELL *et al.*, 2000; DE NIJS, 2008; CAPLAN; SAAG, 2009; WEINSTEIN, 2012). O uso de glicocorticoides foi associado com aumento significativo do risco de qualquer fratura osteoporótica e fratura de quadril quando os dados estavam associados à densidade mineral óssea (DMO). Para fraturas osteoporóticas, a faixa de risco relativo com a idade foi de 2,63 - 1,71 e para fratura de quadril de 4,42 - 2,48 (BRIOT; ROUX, 2008). No entanto, o uso de glicocorticoides reduziu a DMO do colo

femoral (KANIS *et al.*, 2007). Um estudo de controle de caso confirmou que o uso de glicocorticoides quase dobrou o risco de fratura do quadril.

Um aumento na apoptose de osteoblastos e osteócitos tem sido demonstrado em ratos e em humanos tratados com glicocorticoide e podem estar envolvidos na patogênese da osteonecrose associada a este grupo de fármacos (WEINSTEIN *et al.*, 1998). Para examinar a relação espacial entre apoptose do osteócito e osteonecrose induzida por glicocorticóides, foi determinado a prevalência de apoptose na cabeça do fêmur obtida de pacientes que foram submetidos à prótese de substituição do quadril por causa da osteonecrose devido ao tratamento crônico com glicocorticoide (n=5), alcoolismo (n=3), trauma (n=1) e doença falciforme (n=3). Osteócitos apoptóticos abundante e células que revestem o osso esponjoso foram encontrados justapostos à crescente fratura subcondral em fêmures dos pacientes com excesso de glicocorticóides. Em contraste, células ósseas apoptóticas não foram encontradas das amostras retiradas de pacientes com trauma ou doença falciforme e eram raras nos pacientes alcoólatras. Estes resultados indicam que o nome osteonecrose induzida por glicocorticoide é inadequado. O osso não é necrótico; de fato, ele mostra apoptose proeminente de células de revestimento esponjoso e osteócitos. A apoptose do osteócido induzida por glicocorticoide, um defeito irreparável e cumulativo, poderiam perturbar a função da rede mecanosensorial do osteócito e assim iniciar uma sequência inexorável de eventos, levando ao colapso da cabeça femoral (WEINSTEIN *et al.*, 2000).

Quando o uso de glicocorticóides está associado ao uso de BFs, podemos ter o glicocorticoide como um fator risco para o desenvolvimento de osteonecrose induzida por BFs.

2.5 Osteonecrose induzida por Bisfosfonatos

Em 2003, um crescente número de casos foi relatado associando a administração de BFs, principalmente os de administração intravenosa, com uma condição rara de osteonecrose do complexo maxilo-mandibular. Segundo os pesquisadores este processo de osteonecrose caracteriza-se pela morte do tecido ósseo devido fatores locais ou sistêmicos que afetam o fluxo sanguíneo normal,

comportando-se de maneira semelhante à osteorradionecrose, expondo o osso subjacente, facilitando a entrada de microrganismos e conseqüentemente à contaminação. Acredita-se que a osteonecrose resulte de uma interligação entre metabolismo ósseo alterado pelos BFs, trauma local, aumento da necessidade de reparo ósseo, infecção e hipovascularização. Assim, a necrose óssea seria a incapacidade do tecido se reparar e remodelar frente a quadros inflamatórios desencadeados pela mastigação (estresse mecânico), exodontias, irritação por próteses ou infecção dental ou periodontal (MARX, 2003; MARTINS *et al.*, 2009; BOZENA *et al.*, 2011). A diferença crucial para a osteonecrose maxilo-mandibular é o sítio anatômico afetado, estando à maxila e mandíbula em contato direto com a cavidade bucal quando de sua manipulação, sujeitando-se a processos infecciosos (GEGLER *et al.*, 2006).

A American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) definiu as três características necessárias para que essa lesão óssea seja associada aos BFs: paciente está sendo ou foi submetido à terapia dos BFs; exposição necrótica óssea nos maxilares persistindo por mais de oito semanas e nenhuma história de irradiação sobre o sítio anatômico. Sendo essa definição importante na instituição de protocolos de atendimento e terapias da osteonecrose (RUGGIERO *et al.*, 2009).

Com finalidade de se instituir um tratamento adequado para as diversas formas de osteonecrose, os pacientes foram classificados em: pacientes com risco, os quais estão sendo submetidos a tratamento com os BFs, seja por via oral ou intravenosa, e pacientes que já apresentaram osteonecrose por uso de BFs, com uma subclassificação em estágio 1,2 e 3, abaixo descritos (RUGGIERO *et al.*, 2009).

Quadro 1 - Estágios da Osteonecrose

Estágio da Osteonecrose	Características Clínicas
1	Exposição óssea assintomática
2	Exposição óssea com sintomatologia dolorosa e infecção clínica evidente
3	Semelhante ao estágio 2, mas associado a fraturas patológicas, fístula extraoral e extensas áreas osteolíticas em borda inferior de mandíbula

Fonte: AAOMS 2007.

A osteonecrose da mandíbula pode permanecer assintomática por semanas ou meses e só ser reconhecida pela exposição óssea na cavidade oral. Sintomas típicos incluem dor, calor, rubor e edema da área afetada, com perda de dentes e saída de secreção purulenta. O envolvimento pode ser bilateral. O diagnóstico é clínico, todavia exames radiológicos, como radiografias e tomografia, podem ser usados para confirmar o diagnóstico. Além disso, pode ser utilizado a densitometria óssea e o CTX (telopectídeo carboxiterminal do colágeno tipo I) (EDUARDO *et al.*, 2010).

A densitometria óssea é utilizada para medir a massa óssea, o CTx sérico é um marcador de reabsorção óssea que avalia a eliminação de fragmentos específicos produzidos pela hidrólise do colágeno do tipo I (BROZOSKI *et al.*, 2012).

Um protocolo de tratamento que pode ser utilizado considera o tempo e duração da terapia com BFs além de monitorar o CTx (C-telopectídeo) no soro ou na urina, ou seja monitorar o metabolismo ósseo. O telopeptídeo C do colágeno tipo I é considerado um marcador importante da atividade osteoclástica e monitora os níveis de reabsorção óssea (MARTINS *et al.*, 2009; EDUARDO *et al.*, 2010).

A osteonecrose é relativamente comum na mandíbula, pois o local é frequentemente exposto ao ambiente externo quando de exodontias, grandes procedimentos dentários e durante a higiene oral. Outro fator contribuinte para a dificuldade de cicatrização pode ser a particular vascularização da mandíbula através de artérias terminais, já que a hipóxia tecidual inibe a síntese de colágeno, a proliferação fibroblástica e o estímulo à vascularização (SONIS *et al.*, 2009).

Ainda que o desenvolvimento da osteonecrose esteja associado, em sua maioria a lesões traumáticas, o surgimento espontâneo pode ocorrer em até 30% dos pacientes, principalmente em áreas que são facilmente lesadas e recobertas por mucosa fina como, por exemplo, na região da linha milo-hioidea (MAVROKOKKI *et al.*, 2007; LANDESBURG *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2010).

É comum na literatura controvérsias em relação a realizar o tratamento da osteonecrose com a permanência da terapia dos BFs. A AAOMS, propõe que pacientes recebendo por mais de 3 anos BFs por via oral, quando as condições sistêmicas do paciente permitirem, sejam submetidos à descontinuidade do

tratamento com BFs três meses antes e três meses após a realização de procedimentos cirúrgicos, o que poderia diminuir os riscos da osteonecrose.

Contudo, para os pacientes que empregam BFs de uso intravenoso, essa descontinuidade seria indicada por um período de 14 a 21 dias antes das intervenções, ressaltando-se que a decisão de descontinuar o tratamento nesses casos caberia ao médico oncologista ou de outra especialidade responsável pelos cuidados desse paciente. Entretanto, outros autores alegam que os benefícios dessa descontinuidade do uso de BFs são muito limitados pela elevada permanência desses fármacos no organismo. A descontinuidade do uso de BFs não produziria as modificações na estrutura óssea compatíveis com as necessidades de reparo quando da realização de procedimentos cirúrgicos na cavidade bucal, o que pode contraindicar ou limitar tais procedimentos clínicos (MARX; CILO JUNIOR; ULLOA, 2005; RUGGIERO; WOO, 2007).

Fatores como a alteração inflamatória e prescrição de alguns fármacos, incluindo os corticóides e imunossupressores, podem ter papel relevante no desenvolvimento da osteonecrose associado aos BFs (CONTE NETO *et al.*, 2011).

O quadro 2, adaptada de Conte Neto *et al.* (2011), apresenta os fatores de risco para o desenvolvimento de osteonecrose.

Quadro 2 - Fatores de risco para o desenvolvimento de osteonecrose

Relacionados ao fármaco	<ul style="list-style-type: none"> • Potência do bisfosfonato • Duração da terapêutica
Risco local	<ul style="list-style-type: none"> • Anatomia local, sendo na mandíbula mais comum, quando comparado a maxila • Cirurgia dento-alveolar
Fatores prováveis	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Corticoterapia;</i> • <i>Diabetes;</i> • <i>Consumo de tabaco;</i> • <i>Consumo de álcool;</i> • <i>Higiene oral deficiente;</i>

Fonte: CONTE NETO, N. et al. Oral bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rheumatoid arthritis patients: a critical discussion and two case reports. **Head & Face Medicine**, p.1-7, 2011.

A osteonecrose é clinicamente caracterizada por exposição óssea de coloração amarelo-esbranquiçada, as alterações radiográficas tornam-se evidentes quando o envolvimento ósseo é extenso, ou seja, radiografias periapicais ou panorâmicas podem não revelar alterações significantes nos estágios iniciais de osteonecrose, mas após longo período de terapia com BFs é observada osteoclerose óssea. A tomografia computadorizada também auxilia no diagnóstico da doença e planejamento do tratamento (JARDIM JUNIOR; SOUZA, 2005; SCARPA *et al.*, 2010).

2.6 Tratamentos da Osteonecrose

A terapia da osteonecrose é variável, atualmente muito discutida e na maioria dos casos é utilizada uma terapia paliativa no controle da dor. As múltiplas abordagens incluem o uso de analgésicos sistêmicos, debridamento cirúrgico, uso prolongado de antibióticos, laserterapia e oxigenioterapia hiperbárica (neste caso, experiência limitada e controversa) (SOUZA *et al.*, 2009).

Pacientes com exposições ósseas assintomáticas podem ser tratados com irrigação com soluções antimicrobianas, como a clorexidine, além de um rigoroso controle clínico e radiográfico e se necessário uso de antibióticos sistêmicos para evitar infecções secundárias (NICOLATOU-GALITIS *et al.*, 2012).

Em casos onde o sequestro ósseo é sintomático indica-se a remoção do osso necrótico, com menor agressão tecidual possível, além de irrigação constante com solução antimicrobiana e manutenção da antibioticoterapia oral. Tratamento cirúrgico agressivo na maioria dos casos exacerba o quadro de exposição óssea, sendo ineficiente (MARX; CILO JUNIOR; ULLOA, 2005; MARTINS *et al.*, 2009).

3 OBJETIVO

Investigar a associação entre o uso de ácido zoledrônico e o surgimento de alterações ósseas no complexo maxilo-mandibular em ratos submetidos ou não a exodontia. Verificar por microscopia alterações ocorridas na região submetida à exodontia dos animais tratados com ácido zoledrônico e verificar o aparecimento de complicações clínicas pelo tratamento com ácido zoledrônico.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética para uso de animais da Pró-Reitoria de Pesquisa, da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), sob Número:046/2011(Anexo A).

Para a manipulação dos animais foram utilizados os critérios segundo o Manual de Utilização de Animais/Fiocruz (CEUA-FIOCRUZ, 2008).

4.2 Caracterização dos grupos de animais

O conjunto dos animais foi composto de 18 ratos machos jovens (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, provenientes do laboratório Anilab Paulínia/SP, admitidos no biotério da Universidade de Sorocaba (UNISO) com aproximadamente 120g de massa corporal. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos (A,B e C), cada grupo era composto de 6 animais. Os animais dos grupos A e B foram tratados com ácido zoledrônico (Zometa®, Novartis AG, Basileia, Suíça), disperso em soro fisiológico. A dose administrada, para os animais destes grupos, por via intraperitoneal era de 0,6 mg/Kg de massa corporal (MAAHS, 2008; RAHDE, 2010). Nos animais do grupo C foi administrado o mesmo volume de soro fisiológico. Os animais dos grupos A e C foram submetidos também à exodontia dos molares superiores do lado esquerdo.

4.3 Manutenção e manipulação dos animais

Durante o período de estudos, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas de aço inoxidável, acomodadas sobre estantes ventiladas, e alimentados com dieta padrão e água *ad libitum*. Durante o período de permanência dos animais no biotério, o ambiente foi controlado com ciclo alternado de claro e escuro a cada 12 horas e temperatura local foi mantida em $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. A identificação dos grupos foi feita nas gaiolas e nos animais através de numeração na cauda.

Para minimizar o estresse do animal, a manipulação dos mesmos durante a execução do experimento foi realizada fora do biotério, no Laboratório de Biociências/Uniso.

4.4 Administração do Fármaco

Antes da administração do fármaco, os animais eram pesados em balança digital eletrônica. A massa corporal foi registrada para cálculo da dose (0,6mg/Kg). O ácido zoledrônico disperso em soro fisiológico foi administrado por via intraperitoneal com seringa hipodérmica (1mL) e agulha 13x4,4 mm (Figura 2) . Três doses do ácido zoledrônico (Figura 3) foram administradas com intervalos de 28 dias, nos tempos zero; 28 e 56 dias, segundo as recomendações do fabricante.

Figura 2 - Administração do medicamento



Fonte: Elaboração própria.

Figura 3 - Ácido zoledrônico (Zometa®)



Fonte: Elaboração própria.

4.5 Obtenção de imagens radiológicas

Foram obtidas imagens radiográficas para verificar a presença de alterações ósseas (osteoclerose), indicativa de necrose óssea.

Para realizar as tomadas radiográficas (Gnatus 70kVp – 7mA) da região maxilo-mandibular (Figura 4), os animais foram sedados com quetamina e xilazina, respectivamente, nas dosagens de 100 e 10 mg/Kg de massa corporal, por via intramuscular. Os animais foram radiografados na posição normo-lateral. As radiografias foram realizadas após a segunda e terceira administração do ácido zoledrônico e após a exodontia dos molares. O cilindro dos feixes de raios-x foi posicionado em um ângulo de 90° e o tempo de exposição radiológica foi de 0,4 s.

Figuras 4: Radiografias periapicais.



Fonte: Elaboração própria.

4.6 Procedimento Cirúrgico Odontológico (exodontia)

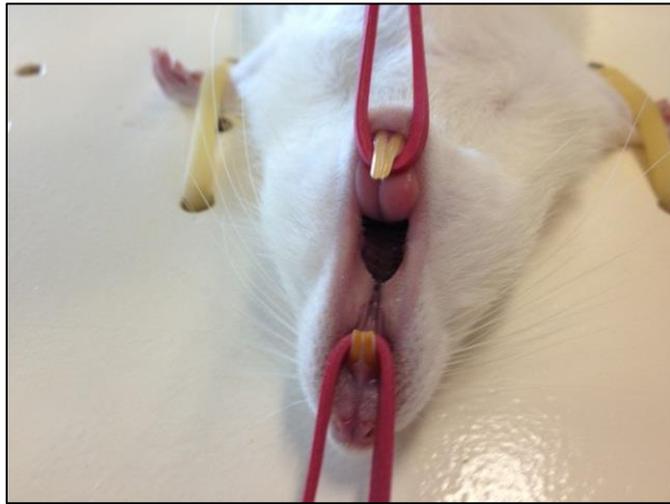
Antes do procedimento cirúrgico foi realizada uma oroscopia para verificar a presença de lesões na cavidade bucal.

A exodontia dos 3 molares do lado esquerdo da maxila foi realizada 07 dias após a 2ª administração do ácido zoledrônico, no 34º dia de permanência dos animais no biotério. Para este procedimento cirúrgico, o animal foi posicionado em decúbito dorsal sobre uma superfície de madeira revestida com material impermeável e sanitizada. A abertura da boca foi mantida com elásticos fixados na superfície de madeira e ancorados nos dentes incisivos superiores e inferiores (Figura 5). Os molares foram descolados com hollemback (3s), luxados e removidos com fórceps, infantil nº 1, com ponta ativa adaptada (Figura 6). Na ferida cirúrgica foi

realizada uma curetagem usando cureta de dentina, e compressão local com gaze para estabilização do coágulo, sem necessidade de sutura.

Para analgesia dos animais, foi administrado dipirona sódica (Dipirona sódica 500mg, Medley, Campinas, São Paulo) em gotas (10 gotas em cada 20 mL) em sua própria mamadeira por 02 dias.

Figura 5: Abertura da cavidade oral



Fonte: Elaboração própria.

Figura.6: Instrumentais utilizados



Fonte: Elaboração própria.

Figura 7: Elemento dental removido



Fonte: Elaboração própria.

4.7 Avaliação Clínica

Durante o período de tratamento os animais foram observados em relação ao comportamento, consumo de ração e água, pH da urina e outros sinais clínicos.

A urina de cada animal foi coletada durante 18 horas e armazenada em frascos de vidros âmbar, previamente lavados e sanitizados. A medida do pH da urina foi realizada nos dias subsequente à administração do ácido zoledrônico, o pH da urina foi medido com fita indicadora de reação da marca JProLab®. O resultado foi imediatamente comparado com o padrão de cores fornecido pelo fabricante da fita indicadora e registrado para análise comparativa.

4.8 Eutanásia

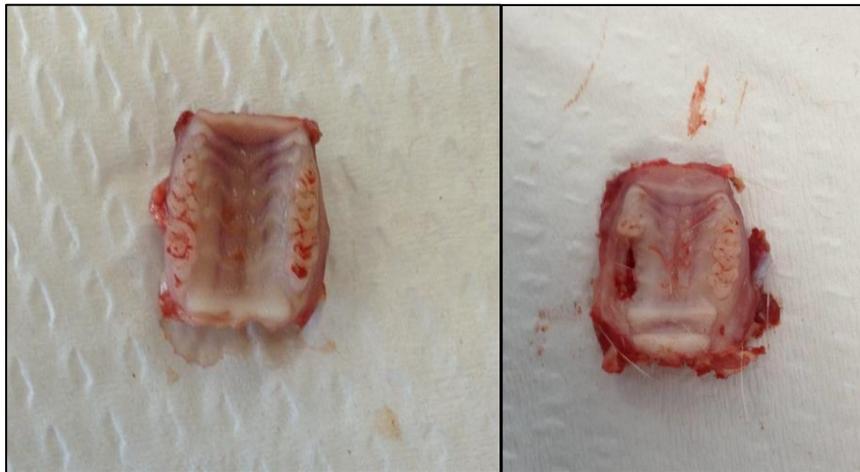
A eutanásia foi realizada por meio de anestesia profunda com isoflurano. Os animais foram submetidos à eutanásia 86 dias após o início do estudo, este período de estudo engloba as 03 administrações de ácido zoledrônico e 52 dias de período pós-operatório, tempo suficiente para que ocorresse o reparo tecidual nos animais submetidos à exodontia, o reparo alveolar em ratos ocorre em média, com 28 dias (VERONESE *et al.*, 2005).

4.9 Preparação das amostras para análise histológica

A preparação das amostras para análise histológica foi realizada em 4 etapas: remoção bilateral do fragmento ósseo da maxila, descalcificação óssea, microtomia e coloração das amostras (MAAHS, 2008) .

Para a remoção do fragmento ósseo, após a eutanásia, o animal foi decapitado. A maxila foi dissecada, removendo os tecidos moles para melhor visualização dos tecidos duros, a secção do fragmento ósseo da maxila foi feita com disco de carbeto de silício (disco de carborundum Dentorium®) em baixa rotação. O fragmento ósseo da maxila foi removido de ambos os lados. Os lados direito (D) e esquerdo (E) foram identificados para posterior manipulação e identificação das amostras. Cada fragmento da maxila (Figura 8 e 9) foi analisado macroscopicamente com auxílio de sonda periodontal milimetrada. E em seguida colocados em cassetes e identificadas.

Figuras 8 e 9: Fragmento da maxila dos ratos



Fonte: Elaboração própria.

Durante a avaliação do protocolo de estudo, previamente estabelecido, foram utilizadas duas técnicas para descalcificação óssea, ambas descritas na literatura.

Técnica 1: Descalcificação com EDTA 5%

A descalcificação óssea das amostras D e E foi realizada em solução de EDTA a 5% (m/v) (RODRIGUES, 2007). As peças foram mantidas submersas por um período de 7, 14 ou 30 dias. A solução de EDTA 5% era renovada com intervalos de dois dias. Após esse período de descalcificação, não foi obtido o resultado

necessário. Por este motivo, neste estudo, foi utilizada a técnica de descalcificação descrita abaixo.

Técnica 2: Descalcificação com KOH e HNO₃

Esta técnica de descalcificação foi realizada tendo como base o MTHBC-Faculdade de Medicina, USP (Manual de Técnicas em Histologia e Biologia Celular do Laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2002) Para a descalcificação óssea com KOH e HNO₃, as amostras fragmento ósseo (D e E) foram previamente tratadas com solução de formol a 10% (v/v) por 48 horas.

Para a descalcificação óssea com solução de KOH a 10% (m/v), as amostras foram mantidas submersas por cerca de 2 horas, com intervalos de 10 a 20 minutos a resistência das amostras eram testadas com auxílio de um alfinete. Após este tempo as amostras eram lavadas em água corrente isenta de íons e mantidas submersas em água purificada, em repouso, durante 12 horas. Sequencialmente, as amostras eram submersas em solução de HNO₃ a 10% (v/v) por mais 2 horas com intervalos de 10 a 20 minutos a resistência das amostras eram testadas com auxílio de um alfinete. Após este tempo as amostras eram novamente lavadas em água corrente isenta de íons e mantidas submersas em água purificada, em repouso durante 12 horas.

Para o corte histológico, as amostras (D e E) previamente descalcificadas, foram desidratadas, diafanizadas, impregnadas com parafina para preparação dos blocos e microtomizadas. Para desidratação, as amostras foram submersas em solução etanólica a 50, 70, 80 % (v/v), durante 35min (cada banho). Em seguida as amostras foram submersas por mais 45 min. em solução etanólica a 90% (v/v) e mais 45 min. em etanol absoluto.

A diafanização foi feita com banho I em xilol por 10 min. e banho II em xilol por mais 10 min.

O processo de impregnação de parafina foi realizado utilizando Paraplast[®] Plus (Sigma-Aldrich Brasil Ltda.). Dois béqueres contendo parafina, para cada amostra, foram mantidos em estufa com temperatura de 70°C até completa fusão do material. As amostras foram imersas no respectivo banho de parafina. O tempo de permanência em cada béquer foi de 15 minutos.

Para realizar o emblocamento das amostras, as mesmas foram retiradas do cassete e colocadas em moldes com parafina previamente fundida. As amostras

eram colocados no molde após o resfriamento parcial da parafina (início do processo de recristalização)

A microtomização foi realizada com lâminas de aço e utilizando micrótomo rotativo numérico MR 400 Laborana. Para o corte das amostras o equipamento foi ajustado para fornecer peças com 3,0 μm de espessura.

A coloração das lâminas foi realizada com solução de hematoxilina de harris modificada e solução alcoólica de eosina Y, da seguinte forma: A lâmina foi desparafinada em estufa com temperatura em torno de 60°C; lavada em água por 4 minutos e corada pela Hematoxilina de Harris modificada por 4 min. Após esse tempo a lâmina foi lavada novamente em água corrente e desidratada em álcool ácido (etanol 94% acidificado com ácido clorídrico 1%), por um tempo suficiente para que os núcleos ficassem diferenciados. Em seguida a lâmina foi lavada em água corrente por mais 10 minutos e corada com eosina Y alcoólica por 3 minutos e lavada com água destilada, fixada com xilol por mais 4 minutos e montada com entelan e lamínulas.

4.10 Análise Histológica

As imagens histológicas foram capturadas por microscópio óptico e capturadas por câmera Motic[®], as análises foram feitas comparativamente com tecido normal e analisadas para presença de alterações anatomo-histológica.

4.11 Análise dos Dados

As variáveis foram descritas por análise descritiva em frequência absoluta e relativa.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que os animais tratados com ácido zoledrônico e submetidos à exodontia (n=6, Grupo A), 60 % apresentaram osteonecrose; os animais tratados com ácido zoledrônico e não submetidos à exodontia (n=6, Grupo B) 100% apresentaram tecido ósseo vital e os animais não tratados com ácido zoledrônico e submetidos à exodontia (n=6, Grupo C) 100% apresentaram tecido ósseo vital. A irritação ocular foi encontrada em 58,3% dos animais tratados com ácido zoledrônico (n=12, Grupos A e B); o pH da urina só foi alterado (pH alcalino) nos grupos tratados com ácido zoledrônico.

Os BFs mais empregados para o tratamento das complicações de neoplasias osteolíticas e da osteoporose são, respectivamente, o ácido zoledrônico e o alendronato (MARX; CILO JUNIOR; ULLOA, 2005). O ácido zoledrônico exibe potência aproximadamente 20 vezes superior à do alendronato (FERNANDES; LEITE; LANÇAS, 2005), por este motivo foi o fármaco de escolha para o estudo.

Entre os principais cuidados adotados para este estudo a administração do ácido zoledrônico, o cálculo da dose terapêutica (0,6mg/kg), o intervalo de administração e a diluição em soro fisiológico foram realizados de acordo com a orientação do fabricante do medicamento, exceto a via de administração (MAAHS, 2008; RAHDE, 2010).

5.1 Obtenção de imagens radiológicas

Foram realizadas imagens radiográficas dos animais (SOUZA *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2011), para verificar a presença dos elementos dentais e algum processo de esclerose óssea que indicasse a presença de necrose.

As imagens radiológicas não registraram alterações que possam ser facilmente visualizadas. Embora a necrose óssea possa ser diagnosticada por imagem radiológica (TREISTER *et al.*, 2009), nem sempre esse exame é conclusivo. Muitas vezes, quando alterações ósseas são observadas nos exames radiográficos o quadro de osteonecrose já está em estágio avançado (GEGLER *et al.*, 2006).

As imagens radiográficas obtidas foram insuficientes para que fossem observadas alterações ósseas. O aspecto radiográfico necessitada de maiores estudos, tendo em vista que a imagem radiográfica é um exame complementar de fácil acesso e baixo custo, que pode auxiliar no planejamento do tratamento da osteonecrose.

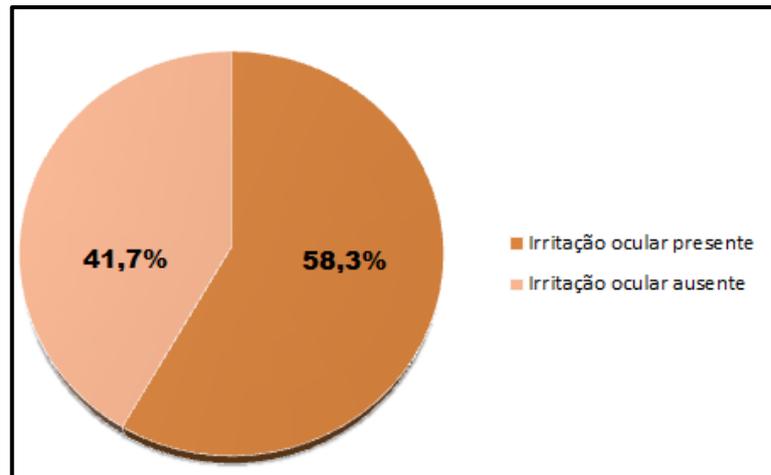
5.2 Avaliação Clínica

Durante o tempo de estudo, a maioria dos animais não apresentou alteração de comportamento ou do padrão de consumo de ração e água. Este fato está relacionado com os cuidados adotados durante a manutenção dos mesmos no biotério, na administração do medicamento e dos anestésicos e principalmente na técnica de exodontia executada. Além disso, o uso de gaiolas metabólicas individuais, a observação do ciclo de luz e conforto térmico contribuíram para manter os animais dentro do padrão normal.

Dentre as alterações observadas durante o estudo constam da bula do medicamento, a anemia, a inflamação periorbital (conjuntivite) e insuficiência renal. Efeitos adversos incomuns como aumento dos níveis séricos de creatinina, fadiga, artralgia, náusea, complicações gastrintestinais e hipocalcemia são relatados (MIGLIORATI *et al.*, 2005; DIMITRAKOPOULOS; MAGOPOULOS; KARAKASIS, 2006).

Assim as alterações clínicas apresentadas foram decorrentes do uso do ácido zoledrônico. De acordo com a bula do medicamento, a conjuntivite é uma reação adversa citada. A figura 10 mostra a proporção de animais que tiveram inflamação periorbital (Figura 11). Esta alteração clínica foi observada em 58,3% dos animais (7/12) tratados com ácido zoledrônico. Segundo relatos da literatura a presença de conjuntivite é maior quando utilizado o BFs intravenoso (PASSOS; ALMEIDA, 2006).

Figura 10 – Irritação ocular nos animais tratados com ácido zoledrônico



Fonte: Elaboração própria.

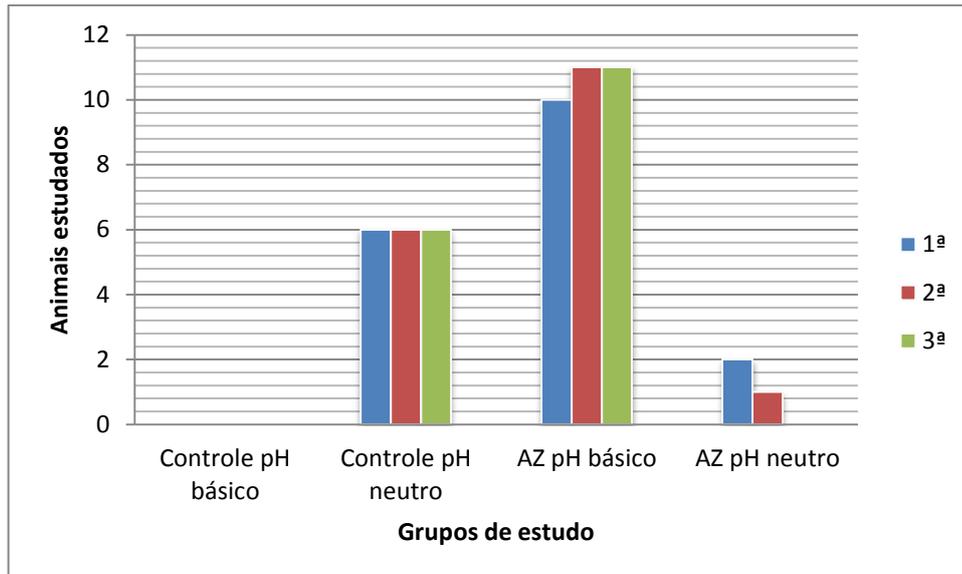
Figura 11 – Inflamação periorbital



Fonte: Elaboração própria.

Uma observação clínica não relatada na literatura, em estudo com animais em uso de ácido zoledrônico, é a alcalinização da urina durante o tratamento. Neste estudo o pH da urina foi alterado na maioria dos animais, que foram submetidos a administração com ácido zoledrônico (Figura 12) . De acordo com a literatura alterações nos túbulos renais podem alcalinizar a urina (HEILBERG; SCHOR, 2003), e contribuir para a disfunção renal que pode evoluir até a uma insuficiência renal (reação adversa descrita na bula).

Figura 12 - Alteração do pH da urina após administração medicamentosa



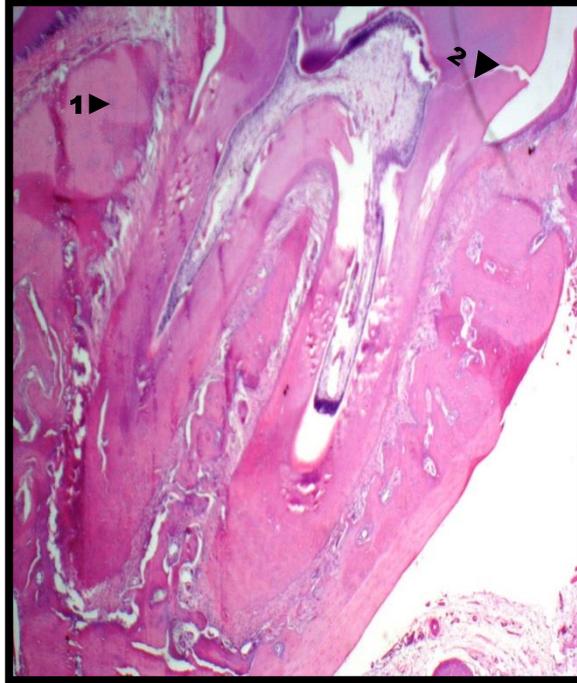
Fonte: Elaboração própria.

Um animal do grupo tratado com ácido zoledrônico apresentou fezes e urina com sangue, além de sinais de fadiga e cansaço, o animal foi a óbito e diante da situação acreditou-se que o mesmo apresentou um quadro avançado de anemia.

5.3 Resultados do estudo histológico

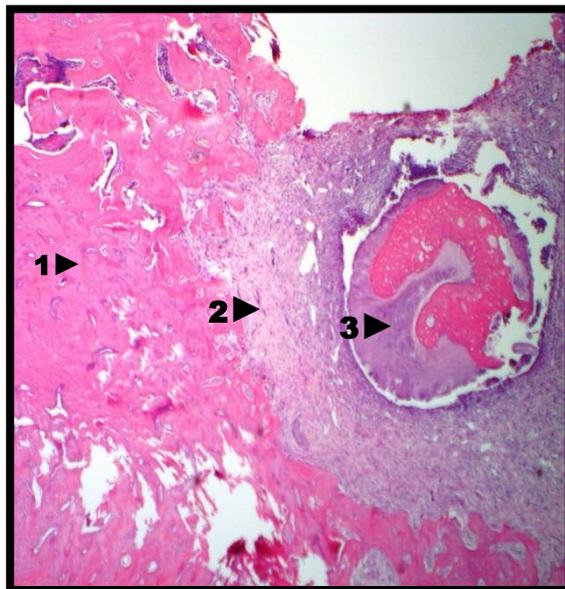
O estudo histológico mostrou que nos animais tratados com ácido zoledrônico sem exodontia, e nos animais não tratados, com exodontia, não houve alteração do tecido ósseo. A figura 13 mostra um corte histológico do molar com ausência de alteração tecidual (grupo C). A figura 14 mostra um corte histológico do processo de cicatrização após a exodontia do molar, com presença de tecido de granulação e nichos bacterianos (grupo A). A figura 15 mostra uma área de tecido dentário e tecido ósseo com padrões dentro da normalidade (grupo B). A figura 16 representa um comparativo entre duas lacunas ósseas, sendo a lacuna à esquerda pertencente ao grupo A e a lacuna à direita do grupo B.

Figura 13 – Corte histológico do molar (HE 4x). 1: Região de crista óssea alveolar com tecido ósseo vital; 2: Estrutura coronária do elemento dental



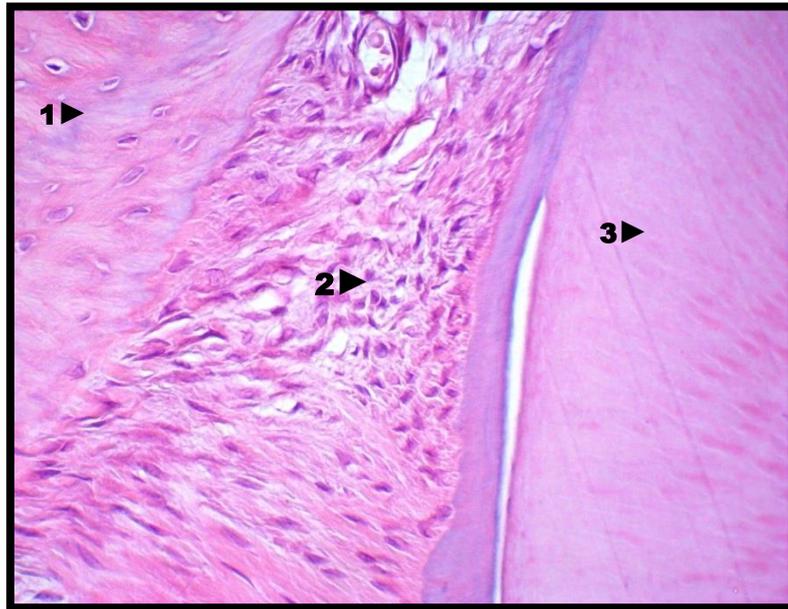
Fonte: Elaboração própria.

Figura 14 – Corte histológico da região pós exodontia (HE 40x). 1: Tecido ósseo vital, com osteócitos; 2: Tecido de granulação; 3: Restos necróticos e nichos bacterianos



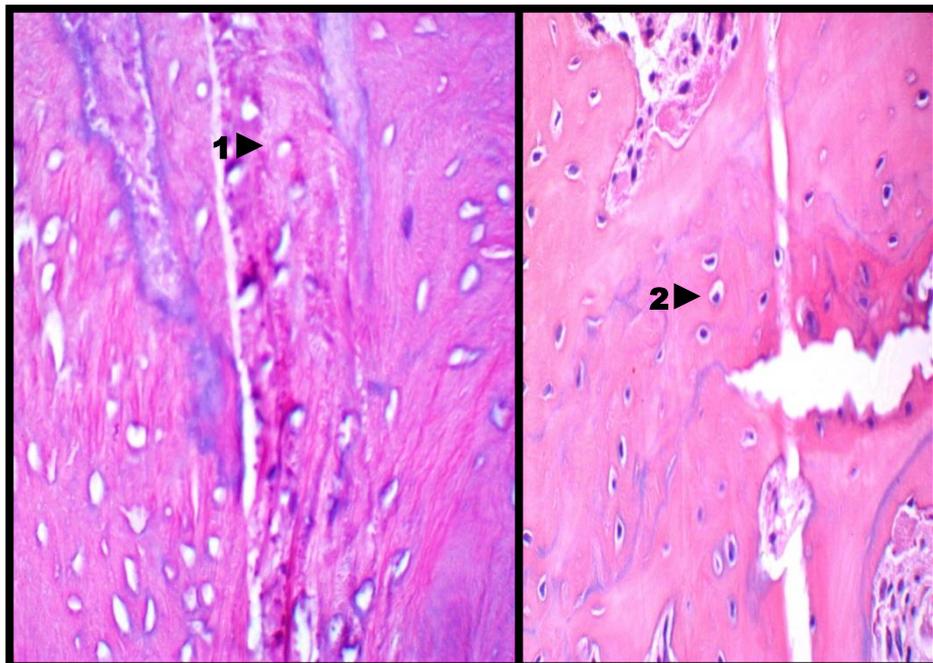
Fonte: Elaboração própria.

Figura 15 - Corte histológico de estrutura dentária (HE 40x). 1: Tecido ósseo vital, com osteócitos;
2: Área de Tecido Ligamentar; 3: Estrutura Dentária, evidenciando os canalículos



Fonte: Elaboração própria.

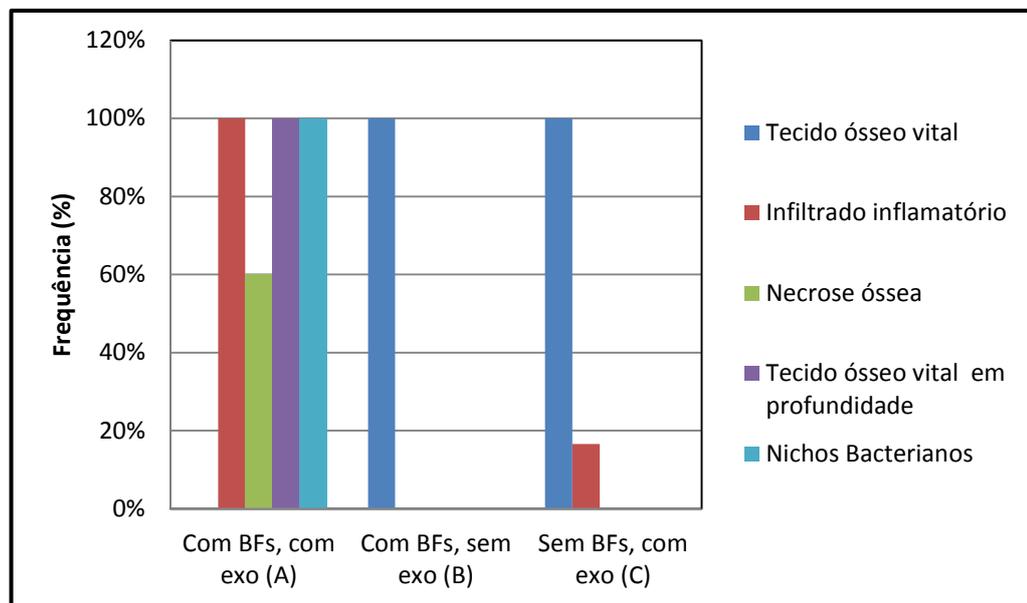
Figura 16 – Corte histológico do tecido ósseo (HE 40x). 1: Lacuna óssea com ausência do osteócito; 2: Área com lacuna com osteócito no interior



Fonte: Elaboração própria.

Os animais que foram tratados com ácido zoledrônico e submetidos a exodontia (grupo A), na área de reparo observa-se presença de infiltrado inflamatório, nichos bacterianos, tecido ósseo vital somente em profundidade e necrose óssea (60%). Os animais tratados com ácido zoledrônico e não submetidos à exodontia (grupo B), na área dos elementos dentais não apresentam alterações ósseas. Os animais não tratados com ácido zoledrônico e submetidos à exodontia (grupo C) também apresentaram tecido ósseo vital na área de reparo cirúrgico. A figura 17 mostra um quadro comparativo das alterações histológicas encontradas nos diferentes grupos de animais.

Figura 17 – Análise Histológica Descritiva dos grupos estudados



Fonte: Elaboração própria.

Os resultados mostram que o uso do ácido zoledrônico de acordo com a posologia sugerida pelo fabricante, provocou necrose óssea (60%) e outras alterações apenas nos animais que foram submetidos à exodontia. Este resultado é um indicativo de que procedimentos cirúrgicos odontológicos podem desencadear necrose óssea. Segundo relatos na literatura a terapia com BFs é fator determinante para o aparecimento do quadro de osteonecrose, e o risco é aumentado quando associado à exodontia (MIGLIORATI *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2010; BOZENA; HRVOJE; MARIJANA, 2011).

As áreas submetidas à exodontia, em animais tratados com ácido zoledrônico, demonstraram retardo na cicatrização devido à alteração do processo de remodelação óssea (LANDESBURG *et al.*, 2008), esses dados reforçam a hipótese que em áreas que ocorrem procedimento cirúrgico odontológico o risco de osteonecrose é aumentado (MAAHS, 2008).

Devido à alteração do processo cicatricial e a colonização microbiana da cavidade oral, para o processo de necrose temos a somatória de cicatrização de tecido mole tardia, exposição óssea e contaminação local (MIGLIORATI *et al.*, 2005; GEGLER *et al.*, 2006; NICOLATOU-GALITIS *et al.*, 2012).

As alterações ósseas induzidas pelo uso de ácido zoledrônico encontradas no estudo corroboram os resultados obtidos na literatura tanto nos estudos com animais como nos relatos de caso clínico (DIMITRAKOPOULOS; MAGOPOULOS; KARAKASIS, 2006; MAAHS, 2008; RAHDE, 2012; CONTE NETO *et al.*, 2011).

Com isso a necessidade de preparo odontológico (exodontia, restaurações, tratamento endodôntico) prévio a terapia é importante. Embora os dados obtidos no presente estudo sejam em animais, vale ressaltar que o grupo que não foi submetido a procedimento cirúrgico odontológico, mesmo estando sob terapia com ácido zoledrônico, não apresentou alterações ósseas (EDUARDO *et al.*, 2010; BOZENA; HRVOJE; MARIJANA, 2011; CONTE NETO *et al.*, 2011; BROZOSKI *et al.*, 2012).

A terapia com BFs é paradoxal. Ao mesmo tempo em que desponta como uma resolução das patologias ósseas traz questões importantes para serem solucionadas, como a osteonecrose. O risco da osteonecrose de fato existe, e as recentes pesquisas buscam a sua resolutividade ainda sem grandes conquistas.

Desta forma, diante da osteonecrose as ações são preponderantemente preventivas, ressaltando que o uso racional do fármaco é essencial, além de acompanhamento odontológico permanente. Para muitos pacientes em terapia com BFs para tratamento de metástase óssea, embora a patologia estivesse estabilizada, os mesmos não tiveram qualidade de vida em função das complicações bucais (MARTINS *et al.*, 2009). Da mesma forma a qualidade de vida de pacientes com osteonecrose causada por tratamento por BFs pode ser preservada a partir de cuidados odontológicos preventivos.

Para prevenir essa complicação, o melhor caminho é a informação e o cuidado dos profissionais envolvidos nesse processo de tratamento. De forma que estejam capacitados para identificar e orientar o usuário de medicamentos a base de BFS quanto aos riscos e as complicações pertinentes do mesmo.

6 CONCLUSÃO

Em função dos resultados obtidos, a presente pesquisa permite concluir que:

- O uso de ácido zoledrônico é fator de risco para o desenvolvimento de osteonecrose, principalmente quando está associado a procedimento cirúrgico odontológico (exodontia);

- A região submetida à exodontia em animais tratados com ácido zoledrônico apresentou infiltrado inflamatório e nichos bacterianos condição que favoreceu a ocorrência de osteonecrose;

7 REFERÊNCIAS

- BLAKE, G. M.; FOGELMAN, I. Role of dual-energy x-ray absorptiometry in the diagnosis and treatment of osteoporosis. **Journal of Clinical Densitometry**, Philadelphia, v.10, p. 102-110, Jan. 2007.
- BOUTSEN, Y. et al. Primary prevention of glucocorticoids induced osteoporosis with intravenous pamidronate and calcium: a prospective controlled 1-year study comparing a single infusion, an infusion given once every 3 months and calcium alone. **Journal of Bone and Mineral Research**, Washington, v.16, p. 104-112, Jan. 2001.
- BOZENA, C.; HRVOJE, H.; MARIJANA, K. Prevention and treatment of osteonecrosis of the jaw. **Journal Health**, Croatia, v. 03, n. 09, p. 557-559, Ago. 2011.
- BRIOT, L.; ROUX, K. Drug-induced osteoporosis: Beyond glucocorticoids. **Current Rheumatology Reports**, Boston, v.10, p. 102-109, Apr. 2008.
- BROZOSKI, M. A. et al. Osteonecrose maxilar associada ao uso de bisfosfonatos. **Rev Bras Reumatol**, São Paulo, p. 260-270, 2012.
- CAPLAN, L.; SAAG, K. Glucocorticoids and the risk of osteoporosis. **Expert Opinion on Drug Safety**, Toronto, v.8, p. 33-47, 2009.
- CARREYROU, J. Fosamax drug could become next Merck woe. **The Wall Street Journal**, Nova Iorque, Apr. 2006.
- CARVALHO, P. S. P. et al. Principais aspectos da cirurgia bucomaxilofacial no paciente sob terapia com bisfosfonatos. **RFO**, Passo Fundo, v.15, p. 183-189, maio/ago. 2010.
- CASTRO, L.; FERREIRA, A.; FERREIRA, E. Bisfosfonatos como transportadores osteotrópicos no planejamento de fármacos dirigidos. **Química Nova**, São Paulo, v.27,n.3 p. 456-460, 2004.
- CEUA-FIOCRUZ. **Manual de Utilização de Animais**/Fiocruz, Rio de Janeiro, 2008.
- CONSOLARO, A.; CONSOLARO, M. F. M. O. Os bisfosfonatos e o tratamento ortodôntico: análise criteriosa e conhecimento prévio são necessários. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, Maringá, v.13, n.4, Jul/ago. 2008.
- CONTE NETO, N. et al. Oral bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rheumatoid arthritis patients: a critical discussion and two case reports. **Head & Face Medicine**, Reino Unido, p.1-7, 2011.
- DE NIJS, R. Glucocorticoid-induced osteoporosis: a review on pathophysiology and treatment options. **Minerva Medica**, Torino, v.99, p. 23-43, 2008.
- DELMAS, P. D. Treatment of postmenopausal osteoporosis. **Lancet**, Oxford, v.359, p. 2018-2026, 2002.

DELMAS, P. D.; CALVO, G. The use of placebo-controlled non-inferiority trials for the evaluation of new drugs in the treatment of postmenopausal osteoporosis. **Osteoporosis International**, Nova Iorque, v.3, p. 1-5, 2002.

DIMITRAKOPOULOS, I.; MAGOPOULOS, C.; KARAKASIS, D. Bisphosphonate-induced avascular osteonecrosis of the jaws: a clinical report of 11 cases. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, Oxford, v.35, p. 588-593, July. 2006.

EASTELL, R. et al. Prevention of bone loss with risedronate in glucocorticoid-treated rheumatoid arthritis patients. **Osteoporosis International**, Nova Iorque, v.11, p. 331-337, 2000.

EDUARDO, F. D. P. et al. Osteonecrose induzida por Bifosfanatos: Patogenia, Características clínicas e Terapêutica. **Prática Hospitalar**, São Paulo, n. 72, Nov-dez. 2010.

ENGELKE, K.; GLUER, C. C. Quality and performance measures in bone densitometry: part 1: errors and diagnosis. **Osteoporosis International**, Nova Iorque, v.17, p. 1283-1292, 2006.

FERNANDES, C.; LEITE, R. S.; LANÇAS, F. M. Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n.2 p. 274-280, Fev. 2005.

GEGLER, A. et al. Bisfosfonatos e osteonecrose maxilar: revisão da literatura e relato de 2 casos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, p. 25-31, 2006.

GLUER, C. Quantitative ultrasound techniques for the assessment of osteoporosis: expert agreement on current status. The International Quantitative Ultrasound Consensus Group. **Journal of Bone and Mineral Research**, Washington, v.12, p. 1280-1288, 1997.

GLUER, C. C.; LU, Y. Quality and performance measures in bone densitometry. Part 2: fracture risk. **Osteoporosis International**, Nova Iorque, v.17, p. 1449-58, 2006.

GUIA, C. M. **Análise da Prevalência de Osteoporose e Fraturas Atraumáticas em mulheres idosas da cidade de São Sebastião DF**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, 2009.

HEILBERG, I.; SCHOR, N. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário - ITU. **Rev Assoc Med Bras**, São Paulo, v. 49, p.109-16, 2003.

JARDIM JR, E. G.; SOUZA, F. R. N. Osteonecrose associada com uso de bisfosfonatos. **Pesq Bras Odontoped Clin Integrada**, João Pessoa, p. 375-380, 2005.

JOHNELL, O.; KANIS, J. A. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. **Osteoporosis International**, Nova Iorque, v.17, n.2, p.1726-1733, Dec. 2006.

- KANIS, J. A.; BURLET, N. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. **Osteoporosis International**, Nova Iorque, v.19, p: 399-428, 2008.
- KANIS, J. A.; JOHNNELL, O. Long-term risk of osteoporosis fracture Malmö. **Osteoporosis International**, Nova Iorque, v.11, p: 669-674, 2000.
- KANIS, J. E. A. The diagnosis of osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, Washington, p. 1137-1141, 1994.
- KANIS, J. et al. Glucocorticoid-induced osteoporosis: a systematic review and cost-utility analysis. **Health Technology Assessment**, Alberta, v.II, 2007.
- LANDESBURG, R. et al. Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. **J Oral Maxillofac Surg**, Oxford, v.66, p.839-47, 2008.
- LIMA, C. A. et al. Lesão lítica de mandíbula em mulher com mieloma múltiplo usuária de bisfosfonatos. **Rev Bras Reumatol**, São Paulo, v. 48, p. 59-61, Jan/fev. 2008.
- LOPES, I. et al. LOPES, Isabel et al. Osteonecrose da mandíbula associada ao uso de bisfosfonatos. **Arq Med**, Porto, v. 23, 2009.
- MAAHS, M. A. P. **Associação entre o uso de bisfosfonatos e osteonecrose maxilar: estudo em ratos**. Tese apresentada como requisito para obtenção para o título de Doutor pelo Programa de Pós Graduação em Odontologia Área de Concentração em Estomatologia Clínica, Faculdade de Odontologia Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2008.
- MANKIN, H. Nontraumatic necrosis of bone (osteonecrosis). **New England Journal of Medicine**, Whittam, v.326, p: 1473-1479, 1992.
- Manual de Técnicas em Histologia e Biologia Celular do Laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, 2002.
- MARSHALL, D. et al. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. **British Medical Journal**, Londres, 312, p: 1254-1259, 1996.
- MARTINS, M. A. et al. Osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos: importante complicação do tratamento oncológico. **Rev Bras Hematol Hemoter**, São José do Rio Preto, p. 41-46, 2009.
- MARX, P. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **J Oral Maxillofac Surg**, Oxford, p. 1115-18, 2003.
- MARX, R. E.; CILO JR, J. E.; ULLOA, J. J. Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. **J Oral Maxillofac Surg**, Oxford, p: 1567-75, 2005.
- MAVROKOKKI, T. et al. Nature and frequency of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in Australia. **J Oral Maxillofac Surg**, Oxford, v.65, p. 415-23, 2007.

MIGLIORATI, C. et al. Bisphosphonate - associated osteonecrosis of mandibular and maxillary bone. **Cancer July**, v. 104, 2005.

MS. Portal da Saúde, 2011. Disponível em:
<<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/2743/162/prevencao-a-osteoporose-deve-comecar-na-infancia.html>>. Acesso em: 04 Setembro 2012.

MURRAY, C. J.; LOPEZ, A. D. The global burden of disease and injury series. **Cambridge, MA: Harvard University Press**, Cambridge, v.2, 1996.

NEME, R. M.; MELO, N. R.; POMPEI, L. P. Bisfosfonatos: estão indicados para as mulheres? **Revista Brasileira de Medicina**, Rio de Janeiro, 2012.

NICOLATOU-GALITIS, O. et al. Jaws osteonecrosis associated with medication: Report of two cases addressing unresolved clinical research questions. **MOJ**, v.1, p.45-51, 2012.

ORTIZ, M. Influência dos bisfosfonatos na movimentação dentária induzida, na frequência e nas dimensões das reabsorções radiculares associadas. **Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru Universidade de São Paulo**, 2004.

ORWIG, D. et al. Osteoporosis in men: update 2011. **Rheum Dis Clin North Am**, Maryland, v.37, p. 401-14, aug, 2011.

PAPAPOULOS, S. E. Use of bisphosphonates in the management of postmenopausal osteoporosis. **Annals of The New York Academy Sciences**, Nova Iorque, p: 15-32, 2011.

PASSOS, A.F; ALMEIDA, P.J.A. Relato de caso: Esclerite associada ao uso de bisfosfonatos. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v.46, n.5, sep/oct, 2006.

RAHDE, N. D. M. **Efeitos dos bisfosfonatos nitrogenados sobre o osso alveolar**. Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós Graduação em Odontologia, Área de Concentração Estomatologia Clínica, Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul., Porto Alegre, 2010.

RIZZOLI, R.; BONJOUR, J. P. Dietary protein and bone health. **Journal of Bone and Mineral Research**, Washington, v.19, p. 527-531, 2004

RUGGIERO, S.L et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw-2009. **Australian Endodontic Journal**, Malden, v.35, n.3, p.119-130, dec, 2009.

RUGGIERO, S. L.; WOO, S. B. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. **Dent Clin North Am**, Maryland, p: 369-76, 2007.

SCARPA, L. C. et al. Osteonecrose nos ossos da maxila e mandíbula associada ao uso de bisfosfonato de sódio. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, Espírito Santo, p: 86-92, 2010.

- SOCIE, G. et al. Avascular necrosis of bone after allogeneic bone marrow transplantation analysis of risk factors for 4388 patients by the Societe Francaise de Greffe de Moelle (SFGM). **British Journal of Haematology**, Londres, v.97, p. 865-870, 1997.
- SONIS, S. T. et al. Bony changes in the jaw of rats treated with zolderonic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonates related osteonecrosis in cancer patients. **Oral Oncology**, Filadélfia, p. 164-172, 2009.
- SOUZA, D. M. et al. Avaliação óssea alveolar de rattus norvegicus por meio dos métodos radiográficos e morfométricos. **Cienc Odontol Bras**, São José dos Campos, v. 8, p.77-84, 2005.
- SOUZA, D. M. et al. Avaliação da perda óssea periodontal em ratos por meio de métodos radiográficos e morfométricos. **Braz J Periodontol**, Piracicaba, v.21, sep, 2011.
- SOUZA, L. et al. Osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos: Revisão de Literatura e Apresentação de um caso clínico. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, v.50, 2009.
- TREISTER, N. et al. Dental panoramic radiographic evaluation in bisphosphonate-associated osteonecrosis os the jaws. **Oral Diseases**, Ottawa, v.15, p.88-92, 2009.
- VANDOME, A. M. et al. Impact of dental care in the prevention of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a single-center clinical experience. **Annals of Oncology**, Oxford, p.193-200, 2012.
- VANSCOCELLOS, D.; DUARTE, M.; MAIA, R. Efeito anti-tumoral dos bisfosfonatos: uma nova perspectiva terapêutica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, p.45-54, 2004.
- VERONESE, R.M. et al. Processo de reparo em feridas de extração dental. Interferência da solução anestésica contendo articaína 4% + Adrenalina 1:100.000: Análise Histológica em ratos. **Revista Odontológica de Araçatuba**, Araçatuba, v.26, n.1, p. 65-72, Jan/jun. 2005.
- WEINSTEIN, R. et al. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects bone. **The journal of Clinical Investigation**, Michigan, v.102, p: 274-289,1998.
- WEINSTEIN, R. et al. Apoptosis of osteocytes in glucorticoids induced osteonecrosis of the hip. **The journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Connecticut, v.85, p: 2907-2912, 2000.
- WEISTEIN, R. Glucocorticoid-induced osteoporosis and osteonecrosis. **Endocrinology and Metabolism of clinical North America**, Maryland, v.41, p: 595-611, 2012.
- WHO. Assesment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. **Thechnical Report Series 843**, Bethesda, 1994.

WHO. Report of the 4th Meeting of the European Union Osteoporosis Consultation Panel, Belgium, v.19, Apr. 2006. Disponível em 10 /12/12.

ANEXO A: Parecer do Cômite de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética no Uso de Animais
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679
Fax: (016) 3351.8025
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
ceua@ufscar.br - www.propq.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais
n° 046/2011

Protocolo n°. 035/2011

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa intitulado "*Avaliação óssea do complexo maxilo-mandibular de ratos tratados com bifosfonatos associado a corticoterapia*" submetido pela pesquisadora Liliane Cristina Ferreira de Souza

São Carlos, 18 de outubro de 2011.


Prof. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais