

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O USO DE BISFOSFONATOS E
OSTEONECROSE DOS MAXILARES:
ESTUDO EM RATOS**

MARCIA ANGELICA PETER MAAHS

2008

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

MARCIA ANGELICA PETER MAAHS

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O USO DE BISFOSFONATOS E OSTEONECROSE DOS
MAXILARES: ESTUDO EM RATOS**

PORTO ALEGRE

2008

MARCIA ANGELICA PETER MAAHS

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O USO DE BISFOSFONATOS E OSTEONECROSE DOS
MAXILARES: ESTUDO EM RATOS**

Tese apresentada como requisito para obtenção do 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

Orientador(a): Dra. Karen Cherubini

Consultor: Dr. Alan Arrieira Azambuja

PORTO ALEGRE

2008



DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais, **Darci e Clarinha**, por serem muito importantes em minha vida. Ao meu esposo **Gerson** que, através do nosso amor, é meu grande companheiro e sempre apóia minhas decisões. Aos meus filhos **Gerhard e Thomas**, meus grandes amigos, por fazerem a vida valer muito a pena. À minha irmã **Débora**, por sempre me incentivar, e aos demais familiares, pelo convívio motivador.



AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, professora Dra. **Karen Cherubini** que de forma serena, séria e responsável objetivou e se fez presente em todas as etapas desta tese, e por ser um grande exemplo de caráter.

Ao médico oncologista Dr. **Alan Arrieira Azambuja** que, por meio de seus conhecimentos e empenho, muito colaborou com o trabalho.

Aos professores deste Curso de Doutorado, que atuaram de forma profissional, séria e estimulante com o objetivo de ensinar. Em especial, à professora Dra. **Liliane Soares Yurgel**, que se fez presente em muitos momentos durante a pesquisa.

Aos professores de Ortodontia da UFRGS Drs. **Eduardo Silveira Ferreira, José Renato Prietsch e Karina Santos Mundstock**, por serem meus exemplos profissionais. Em especial, ao professor **Enio Barcellos Ferreira** que, até hoje, possibilita-me desfrutar de seus conhecimentos, ao professor **Telmo Bandeira Berthold** por estar presente desde o princípio em minha formação profissional e ao professor **Carlos Alberto Mundstock**, pelas oportunidades científicas.

Aos meus colegas do Curso de Doutorado **Elaini Hosni, Sérgio Miguens e Tissiana Rossi**, pela troca de experiências durante as disciplinas cursadas.

Ao laboratório farmacêutico **Novartis**, por fornecer o zoledronato.

À **Faculdade de Farmácia da PUCRS**, por disponibilizar o local para realização do experimento. Em especial, às professoras **Fernanda Morroni e Maria Martha Campos**, pela permissão e assessoramento técnico respectivamente.

À patologista Dra. **Ana Geyer**, pelo auxílio por meio de seus conhecimentos.

Ao professor Dr. **Vinícius Duval da Silva**, do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Lucas da PUCRS, por disponibilizar o equipamento para o processo de captura e análise das imagens histológicas.

Ao professor Dr. **Jefferson Braga Silva** e ao técnico de laboratório **Gilmar Pontes Moreira**, do Laboratório da Faculdade de Medicina - Técnica Operatória, Anatomia Patológica e Microcirurgia da PUCRS, pelo apoio técnico na fase inicial.

À minha colega e amiga Dra. **Cíntia Cense Corrêa**, por ter auxiliado no início desta pesquisa.

A **Deus**, pela vida e saúde!



ΕΠΪΓΡΑΦΕ

*Uma pessoa permanece jovem na medida em que
ainda é capaz de aprender, adquirir novos hábitos
e tolerar contradições.*

Marie von Ebner- Eschenbach
(1830-1916)



RESUMO

RESUMO

A presente pesquisa teve por objetivo investigar se a terapia com bisfosfonato nitrogenado é fator suficiente à ocorrência de osteonecrose maxilar em indivíduos submetidos a exodontias, bem como avaliar os eventos macro e microscópicos que caracterizam a área submetida a exodontias nesses indivíduos. Trinta e um ratos fêmeas (*Rattus norvegicus*, Wistar) foram distribuídos em 3 grupos submetidos a exodontias: (1)11 animais tratados com alendronato por via oral; (2)10 animais tratados com zoledronato por via parenteral e (3)10 animais que não receberam bisfosfonato. Aos 45 dias do início da terapia, os grupos foram submetidos a exodontias e, concluído o prazo de 145 dias, os animais foram mortos. Após avaliação macroscópica, que investigou a presença de solução de continuidade da mucosa, cortes histológicos da área das exodontias foram corados por hematoxilina e eosina (HE) e submetidos a processamento imunoistoquímico empregando-se o anticorpo monoclonal anti-VEGF (VG1). As lâminas coradas por HE foram submetidas à avaliação das variáveis osteonecrose, infiltrado celular inflamatório, colônias microbianas, tecido epitelial, tecido conjuntivo fibroso, resto radicular e osso vital. A expressão imunoistoquímica do VEGF em campo de tecido ósseo vital também foi avaliada. As variáveis foram quantificadas aplicando-se o método da contagem manual de pontos por meio do software Image Pro Plus 6.0. Na avaliação macroscópica, verificou-se que o grupo zoledronato está associado à presença de solução de continuidade da mucosa (qui-quadrado, análise de resíduos ajustados, $P < 0,001$). Nas variáveis osteonecrose, infiltrado celular inflamatório e colônias microbianas, o grupo zoledronato exibiu percentuais significativamente maiores do que os demais grupos. Nas variáveis tecido epitelial, tecido conjuntivo fibroso, resto radicular, osso vital (Kruskal-Wallis, teste de comparações múltiplas, $\alpha = 0,05$) e marcação positiva para VEGF (ANOVA, $P = 0,860$) não houve diferença significativa entre os grupos avaliados. Os resultados permitem concluir que (1) a administração de bisfosfonato nitrogenado por via parenteral está associada à osteonecrose dos maxilares e é condição suficiente para que esta ocorra em indivíduos submetidos a exodontias; (2) o bisfosfonato nitrogenado administrado por via oral não constitui condição suficiente para a ocorrência de osteonecrose maxilar em indivíduos submetidos a exodontias; (3) a administração de bisfosfonato nitrogenado, por via oral ou parenteral, não está associada à diminuição da expressão imunoistoquímica do VEGF em tecido ósseo vital na área das exodontias.

Palavras-chave: Bisfosfonatos. Osteonecrose dos Maxilares. Angiogênese. Zoledronato. Alendronato.



SUMMARY

SUMMARY

The aim of this work was to investigate if nitrogen bisphosphonate therapy is a sufficient condition to determine the occurrence of maxillary osteonecrosis in individuals undergoing tooth extraction, as well to assess the macro- and microscopic features at the site of tooth extraction in this population. Thirty-one female rats (*Rattus norvegicus*, Wistar) were allocated into 3 groups: (1)11 rats treated with oral alendronate; (2)10 rats treated with parenteral zoledronate, and (3)10 rats without bisphosphonate treatment. At the 45th day of drug administration, all groups were submitted to tooth extractions and, as completed 145-day period, the animals were euthanized. After a macroscopic evaluation for the presence of oral mucosal lesion, histological slices of the site of tooth extraction were processed for hematoxylin/eosin staining and immunohistochemistry with anti-VEGF monoclonal antibody (VG1). Osteonecrosis, inflammatory cell infiltrate, microorganism colonies, epithelial tissue, connective tissue, root fragment and vital bone were determined with HE staining. The tooth extraction site was also analyzed for VEGF immunohistochemical expression of vital bone tissue. Variables were quantified by the manual point counting method using the software Image Pro Plus 6.0. Macroscopic analysis showed that the zoledronate group was associated with the occurrence of oral mucosal lesion (chi-square, residual adjusted analysis, $P < 0.001$). The zoledronate group also showed significant higher incidences of osteonecrosis, inflammatory cell infiltrate and microorganism colonies in comparison to the other groups. There was no significant difference for incidence of epithelial tissue, connective tissue, root fragment, vital bone (Kruskal-Wallis, multiple comparison test, $\alpha = 0.05$) and positive staining for VEGF (ANOVA, $P = 0.860$) among the groups analyzed. According to the results, (1) parenteral therapy with nitrogen bisphosphonate is associated with maxillary osteonecrosis and represents sufficient condition for the occurrence of osteonecrosis in individuals submitted to tooth extraction; (2) oral therapy with nitrogen bisphosphonate is not a sufficient condition for the occurrence of maxillary osteonecrosis in individuals submitted to tooth extraction; (3) neither oral or parenteral nitrogen bisphosphonate therapy is associated with lower immunohistochemical VEGF expression of vital bone tissue at the tooth extraction site.

Key words: Bisphosphonates. Osteonecrosis of the Jaws. Angiogenesis. Zoledronate. Alendronate.



LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Estrutura química dos bisfosfonatos	26
Figura 2 – Administração dos fármacos: (A) pesagem dos animais; (B) administração do alendronato, técnica de gavagem oral; (C) administração intraperitoneal do zoledronato	42
Figura 3 – Avaliação clínica.....	42
Figura 4 – Etapas das Exodontias: (A) anestesia; (B) posicionamento do animal e instrumental empregado; (C) procedimento cirúrgico; (D) molares superiores extraídos	44
Figura 5 – Exame macroscópico: (A) sondagem com sonda clínica n° 5 evidencia solução de continuidade da mucosa; (B) espécime sem solução de continuidade da mucosa	45
Figura 6 – Desenho esquemático do preparo do espécime para processamento histológico ...	46
Figura 7 – Preparo do espécime para processamento histológico	46
Figura 8 – Área das exodontias (lado direito) e área oposta (com dentes) contempladas tanto no espécime macroscópico (A) quanto no corte histológico (B, C). HE, aumento aproximado: 100X	48
Figura 9 – Imagens capturadas no sítio das exodontias. HE, objetiva 5X	49
Figura 10 – Quantificação das variáveis histológicas (HE) pelo método de contagem manual de pontos.....	49
Figura 11 – Quantificação da expressão imunohistoquímica do VEGF pelo método de contagem manual de pontos	50
Figura 12 – Distribuição da amostra segundo a presença das variáveis histológicas avaliadas, Porto Alegre, 2008.....	54
Figura 13 – Mediana das variáveis histológicas nos grupos zoledronato, alendronato e controle, Porto Alegre, 2008.....	56
Figura 14 – Osteonecrose: osso não-vital e colônias microbianas. HE, aumento aproximado: 200X	57
Figura 15 – Osso não-vital (A) contíguo ao osso vital (B). HE, aumento aproximado:100X.	58
Figura 16 – Colônias microbianas compatíveis com <i>Actinomyces</i> sp. e infiltrado inflamatório. HE, aumento aproximado: 400X.....	58
Figura 17 – Osteonecrose, colônias microbianas e infiltrado inflamatório. HE, aumento aproximado: 200X	59

Figura 18 – Infiltrado inflamatório (áreas próximas aos restos radiculares): linfócitos, plasmócitos e células gigantes multinucleadas (seta). HE, aumento aproximado: 400X..... 59

Figura 19 – Reparo cicatricial: osso vital, tecido conjuntivo fibroso e revestimento por epitélio pavimentoso estratificado ceratinizado. HE, aumento aproximado: 100X 60



LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição da amostra segundo presença/ausência de solução de continuidade na mucosa oral ao exame macroscópico (área das exodontias), Porto Alegre, 2008.....	52
Tabela 2 – Distribuição da amostra de acordo com presença/ausência das variáveis histológicas avaliadas na área das exodontias, Porto Alegre, 2008.....	54
Tabela 3 – Quantificação das variáveis histológicas (HE) na área das exodontias nos grupos zoledronato, alendronato e controle, Porto Alegre, 2008.....	55
Tabela 4 – Expressão imunohistoquímica do VEGF em área de osso vital nos grupos zoledronato, alendronato e controle, Porto Alegre, 2008.....	57



SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 BISFOSFONATOS	25
2.1.1 Estrutura Química.....	25
2.1.2 Farmacocinética.....	26
2.1.3 Mecanismo de Ação	27
2.1.4 Indicações	29
2.1.5 Efeitos Adversos.....	31
2.1.5.1 Osteonecrose.....	32
3 PROPOSIÇÃO	38
3.1 HIPÓTESE	38
3.2 OBJETIVOS	38
3.2.1 Objetivo Geral	38
3.2.2 Objetivos Específicos.....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 DELINEAMENTO.....	40
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	40
4.3 PROCEDIMENTOS.....	40
4.3.1 Manutenção dos Animais.....	40
4.3.2 Administração dos Fármacos	41
4.3.3 Avaliação Clínica	42
4.3.4 Exodontias	43
4.3.5 Eutanásia, Avaliação Macroscópica e Preparo dos Espécimes	44
4.3.6 Confeção das Lâminas Histológicas	47
4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA	47
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
5 RESULTADOS	52
5.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA	52
5.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA.....	52
5.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	53
5.3.1 Distribuição da Amostra de Acordo com as Variáveis Histológicas (HE)	53

5.3.2	Quantificação das Variáveis Histológicas na Área das Exodontias (HE)	55
5.3.3	Quantificação da Expressão Imunoistoquímica do VEGF em Área de Osso Vital .	56
5.3.4	Análise Descritiva (HE)	57
5.3.4.1	Osteonecrose.....	57
5.3.4.2	Colônias Microbianas	58
5.3.4.3	Infiltrado Inflamatório	59
5.3.4.4	Reparo Cicatricial	60
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS	72
	ANEXOS	86



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A primeira síntese dos bisfosfonatos ocorreu na metade do século XIX, em 1865 na Alemanha, para aplicação na indústria. Em seres humanos, o uso iniciou há cerca de 40 anos (FLEISCH, 1998). Esses compostos têm, em sua estrutura química, uma ligação P-C-P e agem como eficazes inibidores da reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos. Tal propriedade lhes confere indicação no manejo de distúrbios do cálcio e do metabolismo ósseo (FLEISCH, 1987) caracterizadas por aumento da reabsorção óssea, como a doença de Paget, hipercalcemia, metástases ósseas de neoplasias malignas, hiperparatireoidismo primário e secundário e osteoporose (VASIKARAN, 2001).

Desde 2003, a literatura tem relatado casos de osteonecrose dos maxilares em pacientes submetidos à terapia com bisfosfonatos, principalmente após exodontias (CARTER et al., 2005; MARX, 2003; MORTENSEN et al., 2007; RUGGIERO et al., 2004; ZUAZAGA et al., 2006). Fatos intrigantes e ainda não esclarecidos como a restrição da lesão ao complexo maxilomandibular sem acometer outros sítios do esqueleto (MARX et al., 2005) e o desafio que representa à abordagem terapêutica têm despertado a atenção da comunidade científica (MARX, 2003; MIGLIORATI, 2003; MIGLIORATI et al., 2005; PURCELL; BOYD, 2005).

Há relatos de que o uso oral dos bisfosfonatos compreende menor risco à osteonecrose, enquanto a administração intravenosa representa risco elevado (FARRUGIA et al., 2006; PURCELL; BOYD, 2005). Uso de corticosteróides, quimioterapia (SCHWARTZ, 1982; TARASSOFF; CSERMAK, 2003), radioterapia, presença de anemia, coagulopatias, infecções, doenças orais pré-existentes (NOVARTIS ONCOLOGY MEDICAL AFFAIRS & SERVICES, 2004), história familiar, estilo de vida, uso de álcool e tabaco (MIGLIORATI et al., 2005), entre outros, são apontados como fatores de risco. Entretanto, a real necessidade de sua participação no desenvolvimento das lesões ainda é assunto controverso.

Seria o uso do bisfosfonato fator suficiente para o desenvolvimento de osteonecrose em pacientes submetidos a trauma do tecido ósseo do complexo maxilomandibular? O papel dos fatores de risco é fator indispensável à ocorrência das lesões? Existe efetiva diferença de risco à osteonecrose a depender da via de administração do bisfosfonato? As informações de que se dispõe até o momento são, em sua maioria, resultado de pesquisas clínicas que avaliam pacientes portadores da condição. A presente pesquisa teve por objetivo investigar em modelos animais se a terapia com bisfosfonato, pelas vias oral e parenteral, é fator suficiente à

ocorrência de osteonecrose maxilar em indivíduos submetidos a exodontias, bem como avaliar os eventos macro e microscópicos que caracterizam a área submetida a exodontias nesses indivíduos.



REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BISFOSFONATOS

2.1.1 Estrutura Química

Os bisfosfonatos compõem uma classe de substâncias químicas que exibem a ligação P-C-P em sua estrutura. São análogos químicos do ácido pirofosfórico (Figura 1) que, no organismo humano, ocorre como pirofosfato, um inibidor natural da reabsorção óssea. O pirofosfato não pode ser empregado como agente terapêutico no tratamento de doenças ósseas, pois sofre rápida hidrólise enzimática. Os bisfosfonatos, por sua vez, são seus análogos sintéticos, em que o átomo central de oxigênio é substituído por um átomo de carbono. Essa modificação faz com que sejam mais resistentes à degradação enzimática e tenham meia-vida biológica maior, o suficiente para influenciar o metabolismo ósseo (LICATA, 1997). Diferentes substituintes nos radicais R^1 e R^2 , ligados ao carbono central, conferem características únicas para cada fármaco (Figura 1). O grupo R^1 confere aos bisfosfonatos afinidade pelos cristais ósseos, enquanto o grupo R^2 é responsável pela potência e atividade farmacológica (FLEISCH, 1989). A presença do grupamento hidroxila (OH) em R_1 confere maior fixação ao osso e é característica dos fármacos alendronato, etidronato, ibandronato, pamidronato, risedronato e zoledronato. Por outro lado, a presença de cloro (Cl) em R^1 , como acontece com o clodronato, significa fixação reduzida (RESZKA, 2004).

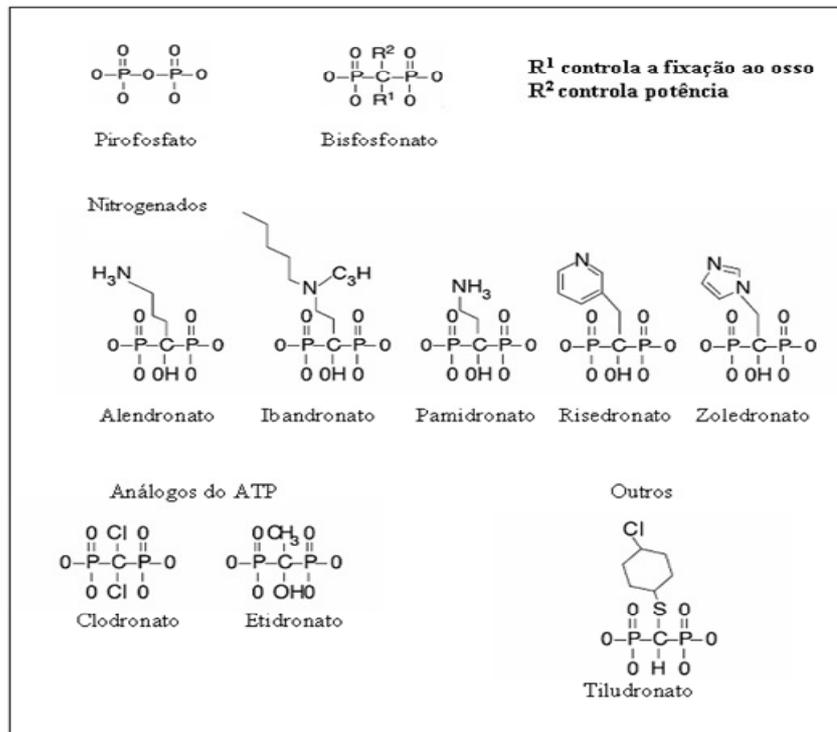


Figura 1- Estrutura química dos bisfosfonatos
 Fonte: Modificado de Reszka (2004)

Existem três gerações de bisfosfonatos. A primeira é composta pelos não-nitrogenados, que inclui os análogos do trifosfato de adenosina (ATP) etidronato, clodronato (LEHENKARI et al., 2002; RESZKA, 2004) e o tiludronato (CARTER et al., 2005), que possui potência anti-reabsortiva similar à do clodronato (ROGERS et al., 2000). A segunda e a terceira gerações são compostas pelos nitrogenados. Os da segunda geração, alendronato, pamidronato (TENENBAUM et al., 2002) e ibandronato (PONTE FERNÁNDEZ et al., 2006), são de 10 a 1000 vezes mais potentes que os da primeira (LIN, 1996). Os da terceira geração contêm uma cadeia cíclica (ROGERS et al., 2000), sendo seus representantes o risedronato e o zoledronato (TENENBAUM et al., 2002). Este último, cuja potência é 100 a 850 vezes superior à do pamidronato, é o mais potente entre os já submetidos a testes *in vitro* e *in vivo* (BODY, 1997).

2.1.2 Farmacocinética

Os bisfosfonatos administrados por via oral são pouco absorvidos pelo organismo (FARIAS, 2005; GERTZ et al., 1991; LIN et al., 1991), com taxa de absorção igual ou

inferior a 1% da dose administrada. A absorção é quase totalmente prevenida com o uso de alimentos que contenham cálcio ou outros íons divalentes que façam o quelamento do fármaco (GERTZ et al., 1991; LIN et al., 1991). Se administrados por infusão intravenosa, são rapidamente removidos do plasma e exibem taxa de excreção renal de 40% nas primeiras 24 horas. Não ocorre metabolização pelo tecido ósseo (KHAN et al., 1997), a excreção renal é a única rota de eliminação. Por outro lado, uma vez ligados ao tecido ósseo, só são liberados quando este sofre reabsorção (LIN, 1996). São resistentes à degradação enzimática, e a meia-vida no esqueleto pode ser superior a um ano (LICATA, 1997). A droga tem efeito cumulativo no tecido ósseo, e dados sugerem que nem toda a fração acumulada seja ativa, apenas aquela que está na superfície óssea, por isso a necessidade de reposição (SATO et al., 1991). Os bisfosfonatos sofrem baixa absorção intestinal em humanos, com biodisponibilidade de cerca de 0,7% para o alendronato, por exemplo (LIN, 1996).

2.1.3 Mecanismo de Ação

A estrutura química dos bisfosfonatos determina, além da fixação ao osso e de sua potência, efeitos intracelulares (LEHENKARI et al., 2002). Os dois efeitos biológicos fundamentais são: inibição da calcificação (normal e ectópica), quando administrados em altas doses, e inibição da reabsorção óssea (FLEISCH, 1998). O mecanismo de ação baseia-se na alta afinidade ao cálcio esquelético e na prevenção da dissolução dos cristais ósseos (LICATA, 1997). Como não são metabolizados, mantêm-se em altas concentrações no osso por muito tempo (RODAN; FLEISCH, 1996), unidos fortemente aos cristais de hidroxiapatita (BARRIOS GONZÁLEZ; GARCÍA NIETO, 2005; LICATA, 1997). Durante a reabsorção, são internalizados pelos osteoclastos (BARRIOS GONZÁLEZ; GARCÍA NIETO, 2005; LICATA, 1997), o que leva, posteriormente, à perturbação desse processo (RODAN; FLEISCH, 1996).

Os diferentes grupos de bisfosfonatos podem atuar por mecanismos distintos, porém seu efeito final é a diminuição do desempenho dos osteoclastos, bem como a indução dos mesmos à apoptose. A droga causa redução precoce da reabsorção seguida por redução tardia da formação óssea. Também *in vitro*, inibem a reabsorção óssea por parte dos osteoclastos, que é estimulada por uma variedade de agentes osteotrópicos, como o hormônio da paratireóide (PTH), o calcitriol, as prostaglandinas e as citocinas. A redução da reabsorção

induz à redução do nível sérico de cálcio, o que leva ao aumento do PTH (VASIKARAN, 2001).

Pesquisas com marcadores bioquímicos demonstraram que os bisfosfonatos inibem a reabsorção e diminuem o *turnover* ósseo (McCLUNG et al., 2005; OYAJOBÍ; MUNDY, 2004). O efeito sobre os osteoclastos ocorre em vários níveis: inibição do recrutamento (HUGHES et al., 1989; FLEISCH, 1993), diminuição do tempo de vida (HUGHES et al., 1995), inibição da atividade do osteoclasto na superfície óssea (MURAKAMI et al., 1995) e ativação da apoptose (FLEISCH, 1993; IGARASHI et al., 1996).

Também tem sido postulado que os bisfosfonatos induzem os osteoblastos, que controlam o recrutamento e a atividade dos osteoclastos em condições fisiológicas e patológicas (COLLIN et al., 1992), a secretar um inibidor da reabsorção osteoclástica (VITTEÉ et al., 1996), a osteoprotegerina (VIERECK et al., 2002). Reinholz et al. (2000), ao empregarem osteoblastos fetais humanos, demonstraram que estes sofrem ação tanto do pamidronato quanto do zoledronato, o que aumenta a formação óssea.

Os bisfosfonatos exibem distintos mecanismos de ação, conforme sejam nitrogenados ou não-nitrogenados. Evidências sugerem que os nitrogenados, que incluem o zoledronato e o alendronato, possuem mecanismo de ação e propriedades farmacológicas sobre a atividade de osteoclastos e células tumorais (SUZUKI et al., 2006), por meio da inibição de uma enzima-chave na via do mevalonato, a farnesil pirofosfato sintase (FPP-sintase), que bloqueia uma via colateral responsável pelo controle da prenilação e ativação das proteínas de sinalização intracelular (SUZUKI et al., 2006; RESZKA, 2004; VASCONCELLOS et al., 2004). Tais eventos conduzem à inativação de GTPases e interferência na transmissão de sinais de algumas citocinas, o que leva à apoptose dos osteoclastos e inibição de sua atividade (RESZKA, 2004; VASCONCELLOS et al., 2004). GTPases como a Ras e a Rho suprimem a reabsorção óssea, levando a mudanças na morfologia e motilidade dos osteoclastos (RESZKA, 2004) e são importantes na organização do citoesqueleto (RESZKA, 2004; VASCONCELOS et al., 2004).

Os bisfosfonatos não-nitrogenados são metabolizados em análogos citotóxicos de ATP, responsáveis pela inibição da função mitocondrial dos osteoclastos, o que resulta em apoptose (ROGERS et al., 2000). A ativação das proteases chamadas caspases tem importância na indução da apoptose. As caspases 3, 8 e 9 podem ser ativadas nos osteoclastos, o que determina a hidrólise de diversas proteínas ao nível da seqüência de aminoácidos DEVD (RESZKA, 2004).

Embora o mecanismo de ação dos bisfosfonatos ainda seja pobremente compreendido (BAGAN et al., 2005; RUGGIERO et al., 2004), há relatos sobre seu efeito antiangiogênico (FOURNIER et al., 2002; KAPITOLA et al., 2000; WOOD et al., 2002). A angiogênese constitui resposta ao aumento da massa tecidual, ou a alterações na tensão de oxigênio, ou ambas, sendo que o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) aumenta com a hipóxia. Em adultos sob condições fisiológicas, a angiogênese só ocorre em situações específicas como a consolidação de fraturas. Na artrite reumatóide, bem como em doenças malignas e cardiovasculares, a mesma é patológica e pode ser excessiva ou insuficiente (SIVAKUMAR et al., 2004). Diminuição da proliferação e aumento da apoptose de células endoteliais foram observados em ratos sob ação dos bisfosfonatos, o que sugere que estes inibam a angiogênese (FOURNIER et al., 2002). O efeito antiangiogênico do zoledronato foi comprovado em ratos, propriedade que respalda seu emprego no tratamento de doenças ósseas malignas e também de outras enfermidades ósseas com componente angiogênico (WOOD et al., 2002). O pamidronato diminuiu significativamente o suprimento sanguíneo ósseo em ratos (KAPITOLA et al., 2000), bem como os níveis séricos de VEGF em pacientes portadores de neoplasia maligna (SANTINI et al., 2002).

2.1.4 Indicações

Os bisfosfonatos são empregados no tratamento de enfermidades com repercussão no metabolismo ósseo. A prescrição da droga a crianças limita-se a casos de osteoporose localizada ou generalizada (osteogênese imperfeita, osteoporose idiopática juvenil, osteoporose secundária a corticosteróides, hiper e hipofosfatase), enfermidades metabólicas ósseas (displasia fibrosa polioestótica, miosite ossificante), calcificações de tecidos moles e condições de hipercalcemia, como hipercalcemias próprias de enfermidades malignas, hipercalcemias da imobilização (crianças com dano cerebral que desenvolvem calcificações heterotópicas em algumas articulações) e hiperparatireoidismo primário (BARRIOS GONZÁLEZ; GARCÍA NIETO, 2005). Também são empregados no tratamento da fibrodisplasia e no alívio dos sintomas da osteogênese imperfeita (VASCONCELLOS et al., 2004), já que diminuem o tempo de vida dos osteoclastos (VEINSTEIN et al., 2002). Em adultos, os bisfosfonatos são empregados no manejo de alterações do cálcio e do metabolismo ósseo (FLEISCH, 1987) em que ocorre excessiva atividade dos osteoclastos, tais como

hiperparatireoidismo primário e secundário e osteoporose, entre outras (FLEICSH, 1998). Atualmente, com o aumento da expectativa de vida da população, a osteoporose tornou-se um importante problema de saúde pública (FERNANDES et al., 2005), o que acarretou o incremento do uso dos bisfosfonatos em sua prevenção, com o objetivo de reduzir a incidência de fraturas (VASIKARAN, 2001).

Os bisfosfonatos são indicados no tratamento da hipercalcemia moderada a severa associada ao câncer e de lesões osteolíticas metastáticas associadas ao câncer de mama e ao mieloma múltiplo, juntamente a agentes quimioterápicos (HILLNER et al., 2000; BERENSON et al., 2002), sendo os intravenosos mais eficazes para este fim (BROWN; COLEMAN, 2002; FARIAS, 2005; PAPAPOULOS et al., 2000). Também são empregados no tratamento da doença de Paget e para metástases ósseas de câncer de pulmão (COLEMAN, 2000) e de próstata (PAPAPOULOS et al., 2000). O zoledronato tem sido o tratamento de eleição para hipercalcemia e dor óssea associadas a neoplasias malignas (BROWN; COLEMAN, 2002) e no tratamento de metástases ósseas do câncer de próstata (GOFFINET et al., 2006). Os bisfosfonatos de administração oral são mais indicados para o tratamento da osteoporose, pois não são tão eficazes no tratamento de lesões osteolíticas malignas (RUGGIERO et al., 2004).

Até 2001, os bisfosfonatos empregados na clínica eram: etidronato, clodronato, pamidronato, alendronato, risedronato, ibandronato e tiludronato (VASIKARAN, 2001). Já em 2002, o zoledronato passa a ser o mais potente (MACERATA, 2002). Segundo Altundal e Gursoy (2005), o alendronato estimula a formação óssea em enxertos autógenos de ratos, pode ser empregado como opção terapêutica para estimular neoformação tecidual em diferentes casos de remodelação óssea. Ainda, tem sido pesquisado na redução da reabsorção dentária e de enxertos, bem como na perda óssea alveolar (LEVIN et al., 2001; SCHENK et al., 1986).

Os bisfosfonatos também foram testados para reforço de ancoragem e contenção dentária, no sentido de minimizarem-se recidivas em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico. Um estudo em ratos demonstrou que tanto a reabsorção óssea, quanto a radicular foram significativamente inibidas durante a movimentação ortodôntica no grupo experimental com administração sistêmica diária de bisfosfonato (IGARASHI et al., 1994). Liu et al. (2004) injetaram clodronato no subperiósteo adjacente ao primeiro molar superior em ratos Wistar submetidos à movimentação ortodôntica. Os autores verificaram redução da movimentação, que foi dose-dependente, diminuição da reabsorção radicular e, ao exame histológico, diminuição significativa do número de osteoclastos.

O zoledronato pode ter efeito antitumoral direto em linhagens hematopoéticas. A droga induz apoptose em linfócitos malignos de origem B independentemente de o paciente já ter ou não recebido algum tipo de quimioterápico e exibir ou não o fenótipo funcional da resistência múltipla a drogas. Assim, o zoledronato tem papel complementar importante na terapia dessas neoplasias (MAIA; VASCONCELLOS, 2004).

Outras aplicações relevantes dos bisfosfonatos têm sido relatadas. Esses fármacos têm-se mostrado ativos sobre o metabolismo de vários protozoários, podendo ser empregados no tratamento da doença de Chagas, da leishmaniose visceral, da malária e da toxoplasmose, doenças que acometem milhões de indivíduos em todo o mundo (FERNANDES et al., 2005).

2.1.5 Efeitos Adversos

Os bisfosfonatos são medicamentos bem tolerados tanto por via oral como intravenosa, mas possuem alguns efeitos adversos. Por via oral, os efeitos adversos mais freqüentes são: cefaléia, dispepsia, diarreia e constipação intestinal. Embora rara, esofagite corrosiva também pode ocorrer, o que contra-indica o uso por via oral. Os efeitos adversos mais freqüentes da administração intravenosa são elevação da temperatura e síndrome gripal, facilmente contornadas com analgésicos e antipiréticos. Podem ocorrer hipocalcemia e hipofosfatemia transitórias, geralmente sem repercussão clínica (BARRIOS GONZÁLEZ; GARCÍA NIETO, 2005). Úlcera gástrica e estenose do esôfago também foram relatadas (PONTE FERNÁNDEZ et al., 2006). Também podem inibir a mineralização óssea, levando a um quadro clínico e histológico de osteomalácia (ADAMSON et al., 1993). Entre os efeitos adversos orais, foram relatadas ulceração do assoalho bucal após uso de alendronato (PONTE FERNÁNDEZ et al., 2006; SCHMUTZ et al., 2005), e osteonecrose dos maxilares (BROOKS et al., 2007; CAPSONI et al., 2006; CARTER et al., 2005; ESTEFANIA FRESCO et al., 2006; GEGLER et al., 2006; GIBBS et al., 2005; MARX, 2003; McCLUNG, 2006; MELO et al., 2005; MORTENSEN et al., 2007; NASE; SUZUKI, 2006; OLSON et al., 2005; RUGGIERO et al., 2004; SANNA et al., 2006; WYNGAERT et al., 2006; WOO et al., 2006; ZUAZAGA et al., 2006).

2.1.5.1 Osteonecrose

A osteonecrose é definida como uma necrose avascular do osso (ASTRAND; ASPENBERG, 2002), que ocorre em pacientes portadores de câncer submetidos a radioterapia, quimioterapia e uso de medicamentos como esteróides (MIRZAI et al., 1999; SCHWARTZ, 1982). É resultante da perda temporária ou permanente do suprimento sanguíneo, sem o qual o osso necrosa e pode entrar em colapso (NASE; SUZUKI, 2006). Usuários de bisfosfonatos podem desenvolver necrose do osso alveolar. A maioria dos casos de osteonecrose relacionados ao uso de bisfosfonatos tem sido conseqüente à administração intravenosa do medicamento, mas também podem decorrer da administração por via oral (FARRUGIA et al., 2006; PURCELL; BOYD, 2005), e muitos desses pacientes têm história de exodontia recente (MIGLIORATI et al., 2005).

A osteonecrose avascular induzida por bisfosfonatos é caracterizada pela destruição do complexo vascular dos maxilares e infecção secundária da matriz óssea (MARX, 2003). Sua definição inclui o critério de que os pacientes com a lesão não tenham sido submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço (RUGGIERO et al., 2004). A terminologia proposta inicialmente foi *avascular necrosis of the jaws* (MARX, 2003). Posteriormente, outros termos foram surgindo como *oral cavity avascular bone necrosis* (MIGLIORATI, 2003), *osteonecrosis of the jaw (ONJ)* (RUGGIERO et al., 2004), *bisphosphonate-associated osteonecrosis (BON)* (MIGLIORATI et al., 2005), *bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaws (BONJ)* (MALDEN; PAI, 2007), *bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ)* (HEWITT; FARAH, 2007).

Ao exame físico, observa-se osso necrótico e infectado exposto ao meio bucal (MIGLIORATI, 2003), bem como eritema e edema do tecido mole circundante (BERTÈ et al., 2006). A área é dolorida, o que compromete a alimentação, a fala e a higiene oral do paciente. A ocorrência de ulceração da mucosa é freqüente, e o osso necrótico exposto apresenta coloração branco-amarelada. O tecido mole circundante geralmente está inflamado em função de infecção secundária, a sondagem do osso é assintomática e não ocorre sangramento. No primeiro estágio, o osso exposto é liso e, com a progressão da lesão, torna-se irregular e sujeito a fraturas durante a mastigação. A dor parece resultar de infecção secundária dos tecidos moles ou de trauma causado pelas irregularidades ósseas aos tecidos adjacentes. A necrose óssea é progressiva e envolve os dentes adjacentes, o que compromete a higiene, facilita a infecção local e leva ao aumento da necrose, com subseqüente mobilidade e

perda dentária (MIGLIORATI et al., 2005). Também pode ocorrer comunicação buco-sinusal, fístula cutânea com supuração (MORTENSEN et al., 2007), inflamação crônica e odor fétido da lesão (FARRUGIA et al., 2006).

A área posterior da mandíbula, na região de molares, é a mais acometida (MARX et al., 2005; PONTE FERNÁNDEZ et al., 2006), seguida da região posterior da maxila (MARX et al., 2005), principalmente em casos em que são realizadas exodontias. Porém, mesmo sem história de procedimento dento-alveolar recente, pode haver sinais de osteólise (RUGGIERO et al., 2004) e ocorrer necrose avascular dos maxilares com exposição óssea espontânea (MARX, 2003; MIGLIORATI, 2003). Os casos espontâneos podem ser atribuídos a características anatômicas e fisiológicas, pois geralmente ocorrem na região posterior da mandíbula, que apresenta mucosa de espessura fina (MARX, 1983). Também existem relatos de casos em que a prótese parcial removível, ao traumatizar a mucosa, foi considerada fator desencadeante da osteonecrose em pacientes usuários dos bisfosfonatos (BROOKS et al., 2007; GEGLER et al., 2006). Além disso, os casos espontâneos na mandíbula podem resultar das peculiaridades da vascularização nesse osso, cujas artérias são terminais. Esse é um dos motivos por que a quimioterapia também está associada a casos de osteonecrose (BAGAN et al., 2005).

A supressão dos osteoclastos altera a qualidade do osso e favorece a ocorrência da osteonecrose (NASE; SUZUKI, 2006), juntamente a outros fatores como trauma local que não cicatriza, o que propicia infecção pela microbiota comensal (BAGAN et al., 2005; WYNGAERT et al., 2006). O tratamento ortodôntico também pode aumentar o potencial para osteonecrose em pacientes que fazem uso de bisfosfonatos (IGARASHI et al., 1994), pois estes levam à diminuição significativa do número de osteoclastos (LIU et al., 2004), o que torna o tratamento ortodôntico mais longo (IGARASHI et al., 1994). É necessário cautela na avaliação ortodôntica de tais pacientes, pois, em seus tratamentos, devem ser evitadas terapia invasiva com laser, ancoragem com miniimplantes e exodontias (GRAHAM, 2006).

Embora exodontias e cirurgias orais sejam consideradas fatores desencadeantes, existem evidências de que o osso alveolar pode estar envolvido previamente. Como fator de risco, em pacientes com câncer, a quimioterapia e a corticoterapia concomitante (SCHWARTZ, 1982; TARASSOFF; CSERMAK, 2003) podem resultar em imunossupressão e predispor à ocorrência de infecção após traumas orais menores (PURCELL; BOYD, 2005). A radioterapia também é fator de risco, e existem condições de co-morbidade como anemia, coagulopatias, infecções, doenças orais pré-existentes (NOVARTIS ONCOLOGY MEDICAL AFFAIRS & SERVICES, 2004), história familiar, estilo de vida, bem como uso de álcool e

tabaco (MIGLIORATI et al., 2005). Com base na história, características clínicas, resposta à cirurgia e aos antibióticos que pacientes portadores de osteonecrose sob terapia com bisfosfonatos desenvolveram, parece que a patogênese da enfermidade está associada à insuficiência vascular local. Uma vez comprometido o suprimento vascular por radioterapia ou drogas, necrose e osteomielite podem ocorrer (RUGGIERO et al., 2004).

A osteonecrose associada aos bisfosfonatos parece restringir-se ao complexo maxilomandibular. Não há na literatura relato de lesão em outros ossos do corpo decorrente do uso dessas drogas. A explicação para tal fato seria a presença dos dentes (MARX et al., 2005), pois os maxilares são os únicos ossos do corpo expostos ao meio externo via dentes (MARX, 2003; RUGGIERO et al., 2004). Além disso, essas estruturas apresentam, freqüentemente, doença periodontal, abscessos, lesões endodônticas e outras lesões (MARX et al., 2005), o que requer metabolismo ósseo e suprimento sanguíneo adequados para manter o equilíbrio. Assim, o *turnover* ósseo alterado pela inibição da reabsorção osteoclástica e insuficiência vascular é incapaz de responder adequadamente às exigências metabólicas, o que resulta em necrose óssea avascular (RUGGIERO et al., 2004). Ainda, os ossos maxilares estão constantemente submetidos a forças de impacto e conseqüente alta taxa de remodelação óssea (MIGLIORATI et al., 2005). Os bisfosfonatos, por sua vez, ao inibirem tal remodelação, a despeito da maior demanda necessária à manutenção da vitalidade, predis põem o tecido à osteonecrose (McMAHON et al., 2004).

Em estudo de revisão de 119 casos de osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos, foi verificado que 45 casos (37,8%) ocorreram após exodontia, em 34 (28,6%), havia doença periodontal evidente; em cinco (11,2%), havia sido realizada cirurgia periodontal; em quatro (3,4%), implante dentário; e, em um (8%), apicectomia. Porém, 30 casos (25,2%) tiveram osteonecrose espontânea, a despeito da ausência de problemas dentários aparentes ou de traumas (MARX et al., 2005). A avaliação de pacientes por um período de seis anos verificou que, em cada 100 indivíduos portadores de câncer que utilizaram bisfosfonatos, ocorreram 5,48 eventos nos maxilares e, em cada 100 pacientes com câncer que não utilizaram bisfosfonatos, apenas 0,30 eventos ocorreram (WILKINSON et al., 2007).

As características histológicas da osteonecrose maxilar incluem osso necrótico com colônias bacterianas e tecido de granulação (MORTENSEN et al., 2007), bem como diminuição da vascularização e do número de osteoblastos (MIGLIORATI et al., 2005). Segundo Bertè et al. (2006), espécimes biopsiados da lesão exibem colônias fúngicas e bacterianas. Em pacientes neoplásicos, tais lesões ocorrem independentemente da existência

de metástases nos maxilares (FARRUGIA et al., 2006; MIGLIORATI et al., 2005; MORTENSEN et al., 2007).

Embora, ao exame físico, a osteonecrose associada aos bisfosfonatos seja semelhante à osteorradionecrose, ao exame histológico ambas constituem condições distintas. Na osteorradionecrose, as lesões exibem áreas homogêneas extensas de osso completamente necrótico, enquanto nas lesões associadas aos bisfosfonatos o osso necrótico ocorre junto a áreas de osso vital residual. Colônias de *Actinomyces* sp. e infiltrado inflamatório estão presentes tanto nos casos de osteorradionecrose, quanto nos de osteonecrose por bisfosfonatos (HANSEN et al., 2006).

Por meio de exames de cultura, Mortensen et al. (2007) verificaram que os pacientes com osteonecrose por uso de bisfosfonatos apresentavam microbiota oral normal. Badros et al. (2006) investigaram casos de osteonecrose mandibular em pacientes portadores de mieloma múltiplo. Ao exame histológico, foram observadas inflamação similar à osteomielite e áreas de osso necrótico acelular. O exame microbiológico exibiu *Actinomyces* sp. em sete dos 20 pacientes da amostra. Outras espécies como *Peptostreptococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Eikenella* sp, *Prevotella* sp., *Porphyromonas* sp. e *Fusobacterium* sp. foram observadas em nove pacientes, porém sua contribuição à infecção de tecidos moles e osteomielite é desconhecida.

Nase e Suzuki (2006) relatam o caso de uma paciente que fazia uso de alendronato, via oral, havia cinco anos e apresentou osteonecrose do osso alveolar. A mesma havia sido submetida a procedimento periodontal de aumento de coroa clínica. Brooks et al. (2007) relatam dois casos associados ao risedronato, um em toro mandibular com uso de prótese parcial removível e outro após enxerto e implante dentário em região posterior da maxila. Ao revisarem 22 artigos, Wyngaert et al. (2006) verificaram 225 casos de osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos, o que correspondeu à prevalência de 1,5%. Os bisfosfonatos nitrogenados envolvidos eram pamidronato, zoledronato, alendronato e risedronato. Embora a dor tivesse sido o sintoma predominante (81,7%), 12,2% dos casos eram assintomáticos. Em 69,3% dos casos havia sido realizada exodontia prévia. No momento do diagnóstico, 74,5% dos pacientes relatavam quimioterapia e 38,2%, uso de corticosteróides. Embora vários tratamentos conservadores e cirúrgicos tivessem sido tentados, em 72,5% dos casos persistiram sítios residuais de osteonecrose.

O diagnóstico precoce das lesões ósseas em pacientes sob terapia com bisfosfonatos é essencial à prevenção e redução da morbidade resultante de lesões destrutivas avançadas do osso maxilar (RUGGIERO et al., 2004). A interrupção do uso do medicamento previamente

às exodontias não garante a prevenção da osteonecrose, uma vez que o fármaco persiste no tecido ósseo (MARX et al., 2005; PURCELL; BOYD, 2005), e as lesões costumam aumentar de tamanho a despeito das tentativas de tratamento (BERTÈ et al., 2006; MIGLIORATI, 2003). A remoção do osso adjacente à lesão está contra-indicada, pois pode causar exposição óssea ainda maior. A remoção de dentes alivia a dor momentaneamente, mas pode levar a maior exposição óssea e dor. O recobrimento do osso com retalhos não é eficaz, pois estes podem fistulizar e intensificar a exposição óssea (MARX, 2003). Inúmeras abordagens terapêuticas já foram propostas, como uso de colutórios (PURCELL; BOYD, 2005), antibióticos sistêmicos, oxigênio hiperbárico e cirurgia, mas nenhuma se mostrou efetiva (MIGLIORATI et al., 2005; PURCELL; BOYD, 2005). Os pacientes têm baixa qualidade de vida em função da complicação oral, mesmo que a neoplasia maligna esteja estabilizada (MIGLIORATI, 2003).

A prevenção das lesões requer avaliação e adequação bucal dos pacientes (PURCELL; BOYD, 2005). Exame clínico-radiográfico da cavidade oral bem como qualquer intervenção invasiva que se faça necessária precisam ser realizados previamente à instituição da terapia com bisfosfonato. Se o paciente for submetido a procedimento oral invasivo, preconiza-se aguardar um mês para completa cicatrização antes de iniciar a terapia. Exame clínico da cavidade oral deve ser realizado a cada quatro meses, com recomendação de controle de placa e medidas efetivas de higiene oral. Por ocasião das avaliações, o cirurgião-dentista tem o dever de examinar cuidadosamente a cavidade oral no intuito de investigar exposição de tecido ósseo. Exame radiográfico completo para avaliar sinais de osteólise, osteoesclerose, espessamentos do espaço periodontal e lesão de furca deve ser requerido. Se houver necessidade de prótese, a mesma deverá ser, preferentemente, fixa e bem aliviada, a fim de evitarem-se úlceras traumáticas (PONTE FERNÁNDEZ et al., 2006). O número crescente de pacientes portadores de osteonecrose dos maxilares, a pobre resposta da condição ao tratamento cirúrgico e o envolvimento de fatores dentários exigem cuidados odontológicos profiláticos em pacientes de alto risco (WALTER et al., 2007), uma vez que o melhor caminho é a prevenção (DIEGO et al., 2007; HEWITT; FARAH, 2007).



PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

3.1 HIPÓTESE

A administração de bisfosfonatos nitrogenados, por via oral ou parenteral, está associada ao desenvolvimento de osteonecrose maxilar em indivíduos submetidos a exodontias.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo Geral

Verificar se o uso de bisfosfonatos nitrogenados é condição suficiente para o desenvolvimento de osteonecrose dos maxilares em indivíduos submetidos a exodontias.

3.2.2 Objetivos Específicos

- a) Verificar os eventos macro e microscópicos da região submetida a exodontias em ratos sob terapia com bisfosfonatos nitrogenados;
- b) Verificar se o uso de bisfosfonatos nitrogenados está associado à diminuição da angiogênese.



MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO

O presente estudo classifica-se como experimental verdadeiro, sob o paradigma quantitativo (CAMPBELL; STANLEY, 1979).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi constituída por 31 ratos (fêmeas, *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) provenientes do Biotério da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL, RS) com idade média de 140 dias e peso médio de 240,66g.

Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em três grupos:

- a) grupo alendronato: 11 animais aos quais foi administrado bisfosfonato nitrogenado por via oral (alendronato) e que foram submetidos a exodontias;
- b) grupo zoledronato: 10 animais aos quais foi administrado bisfosfonato nitrogenado por via parenteral (zoledronato) e que foram submetidos a exodontias;
- c) grupo-controle: 10 animais que foram submetidos a exodontias sem fazerem uso de bisfosfonato.

4.3 PROCEDIMENTOS

4.3.1 Manutenção dos Animais

O projeto do presente estudo foi aprovado pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS e pelo Comitê de Ética em Pesquisa- PUCRS (Anexos

A e B). Os critérios empregados para manipulação dos animais no laboratório basearam-se em Lopes (1992) e Paiva et al. (2005).

Os animais foram identificados com números nas caudas, mantidos em caixas plásticas apropriadas, dispostas em estante ventilada (Alesco, Monte Mor, SP, Brasil), com temperatura controlada (22 °C) e ciclo claro-escuro de 12 h (luzes acesas às 07h00min; luzes apagadas às 19h00min). A maravalha foi trocada três vezes por semana e ração (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil) e água filtrada foram disponibilizadas *ad libitum*. Nenhum procedimento experimental foi realizado no espaço destinado à manutenção dos animais, a fim de evitar-se qualquer tipo de estresse comportamental. Os tratamentos e procedimentos cirúrgicos foram conduzidos no Laboratório de Farmacologia Aplicada da Faculdade de Farmácia – PUCRS.

4.3.2 Administração dos Fármacos

Os bisfosfonatos empregados foram o alendronato de sódio (Galena Química e Farmacêutica, Campinas, SP, Brasil) e o zoledronato (Zometa[®], Novartis, São Paulo, SP, Brasil). Para administração dos fármacos, o animal foi contido colocando-se a mão sobre o dorso e a caixa torácica, e a cabeça foi segurada com o polegar e o indicador, imediatamente atrás da mandíbula. A primeira administração de ambos os fármacos foi realizada ao início do experimento, após identificação e pesagem dos animais. Posteriormente, a administração do alendronato foi realizada a cada 7 dias, na dosagem de 0,05mg/kg, pela técnica de gavagem oral (HUANG et al., 2005; LEHMAN JUNIOR et al., 2004), por 23 semanas. Aos animais do grupo zoledronato foram administradas 5 doses de 0,6mg/kg, por via intraperitoneal com seringa de insulina, a intervalos de 28 dias (MACERATA, 2002). A pesagem dos animais para cálculo das dosagens foi realizada a cada 28 dias em todos os grupos (Figura 2).

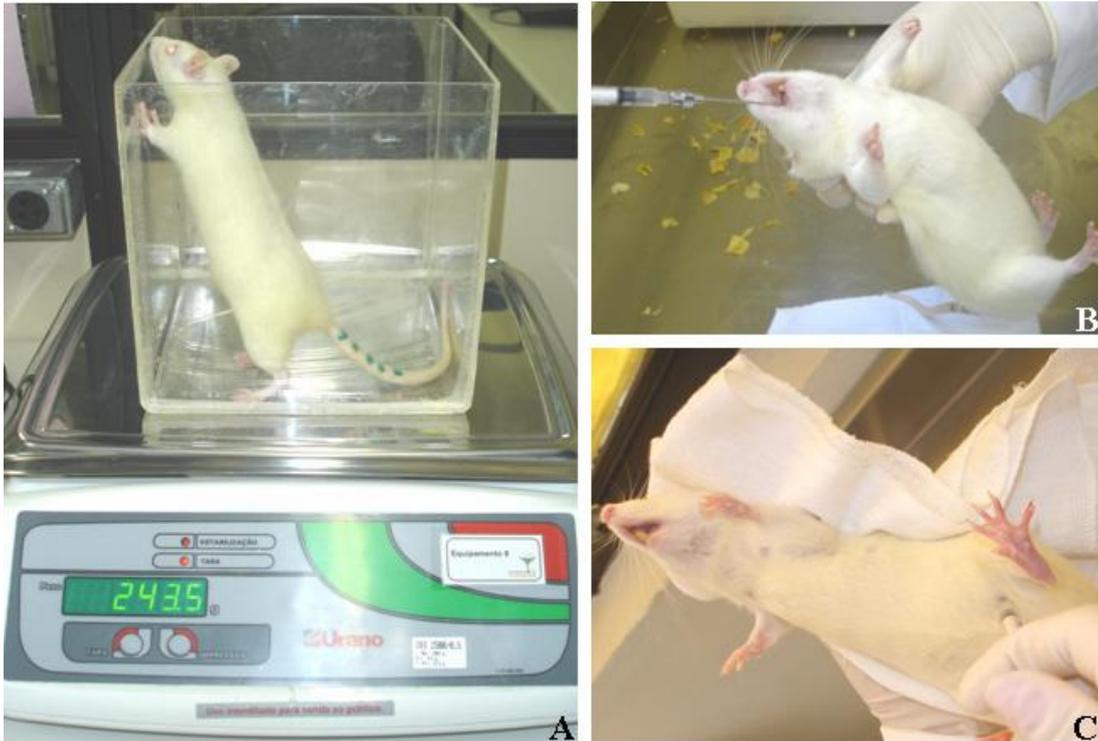


Figura 2 – Administração dos fármacos: (A) pesagem dos animais; (B) administração do alendronato, técnica de gavagem oral; (C) administração intraperitoneal do zoledronato

4.3.3 Avaliação Clínica

Foi realizada oroscopia após a anestesia prévia às exodontias com o objetivo de avaliar presença/ausência de lesão oral (Figura 3).



Figura 3 – Avaliação clínica

4.3.4 Exodontias

As exodontias foram realizadas 45 dias após o início do experimento, sob anestesia profunda com mistura de quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), administrada por via intraperitoneal (GRATTON et al., 1995; WAYNFORTH; FLECKNELL, 1994). A anestesia ocorre entre 2 e 5 minutos após a injeção da mistura anestésica e dura aproximadamente 40 minutos. Essa mistura anestésica é também indutora de profunda analgesia. A recuperação total acontece em cerca de 2 horas e não deixa seqüelas.

O animal foi posicionado em decúbito dorsal, mantendo-se abertura de boca com elásticos (tipo atilho) ancorados nos incisivos superiores e inferiores, distendidos e fixados à mesa operatória por meio de alfinetes. O dispositivo proporcionou imobilização da maxila e adequado acesso ao campo operatório durante as exodontias. Foram extraídos os 3 molares superiores do lado direito empregando-se movimento de alavanca com espátula 3s (SSWhite, Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) adaptada para luxação e fórceps (Edlo, Canoas, RS, Brasil) cuja porção ativa foi adaptada ao tamanho dos dentes. Durante o procedimento cirúrgico, foi realizada irrigação com soro fisiológico. Não houve necessidade de sutura pós-operatória em função da pequena exposição óssea provocada (Figura 4). Os animais fizeram uso de paracetamol gotas para analgesia (10 gotas em 20 ml de água) em sua própria mamadeira e à vontade, durante 4 dias.

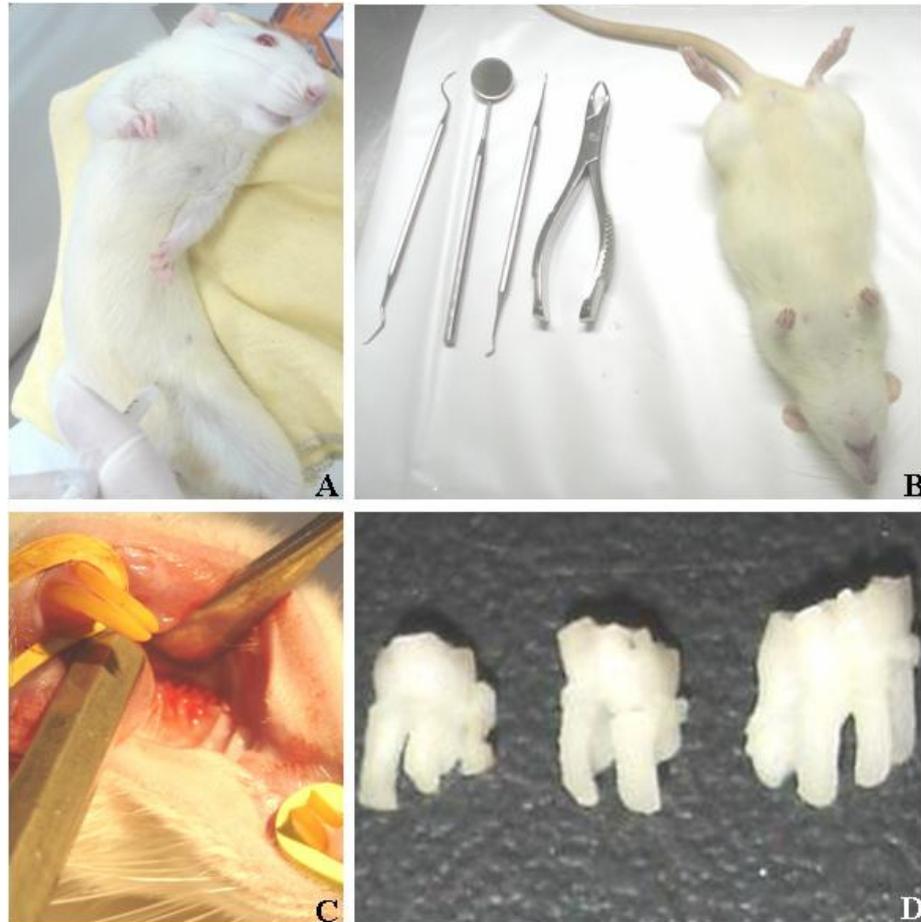


Figura 4 – Etapas das exodontias: (A) anestesia; (B) posicionamento do animal e instrumental empregado; (C) procedimento cirúrgico; (D) molares superiores extraídos

4.3.5 Eutanásia, Avaliação Macroscópica e Preparo dos Espécimes

A eutanásia foi realizada por anestesia profunda com isoflurano (Cristália, Porto Alegre, RS, Brasil) como postulado por Close et al. (1996, 1997) e Waynforth e Flecknell (1994), decorridos 106 dias das exodontias no grupo-controle, 113 dias no grupo zoledronato e 119 dias no grupo alendronato. Após a eutanásia, os animais foram decapitados para facilitar a dissecação da maxila. As maxilas foram dissecadas e submetidas à avaliação macroscópica que teve por objetivo verificar presença/ausência de solução de continuidade da mucosa oral na área das exodontias, por meio de sondagem com sonda clínica número 5 (SSWhite, Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (Figura 5). Os espécimes (maxilas) foram, então, fixados durante 24 horas em solução de formalina a 10% tamponada constituída por formaldeído a 37% (2 L, TopGlass, Porto Alegre, RS, Brasil), água destilada (18 L, TopGlass,

Porto Alegre, RS, Brasil), fosfato de sódio monobásico (80g, Cromoline, Diadema, SP, Brasil) e fosfato de sódio bibásico (130g, Synth, Diadema, SP, Brasil).

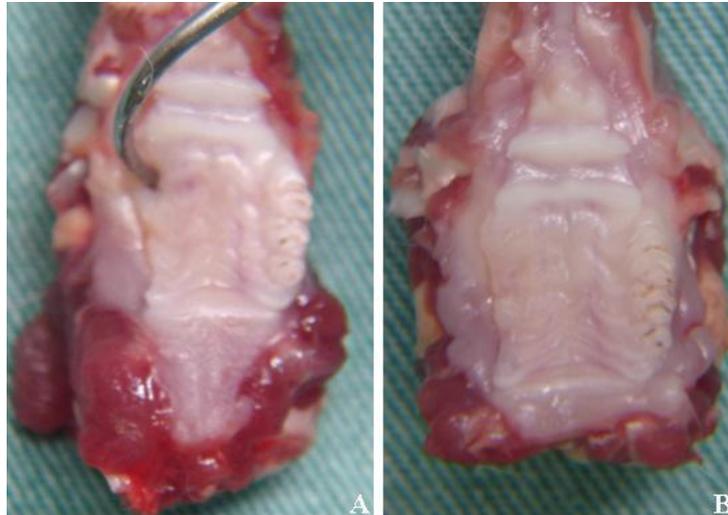


Figura 5 – Exame macroscópico: (A) sondagem com sonda clínica n° 5 evidencia solução de continuidade da mucosa; (B) espécime sem solução de continuidade da mucosa

Após a fixação, as maxilas foram seccionadas em sentido látero-lateral, obtendo-se uma secção transversal que contemplava tanto a área das exodontias quanto a área oposta, em que os molares foram preservados. O objetivo de tal procedimento consistiu em obter-se um espécime de tamanho adequado e com parâmetros suficientes para a identificação dos sítios e reparos anatômicos por ocasião da inclusão em parafina, bem como ao exame histológico. O espécime foi, então, dividido em dois fragmentos (A e B) em sentido látero-lateral (Figuras 6 e 7), com auxílio de disco de lixa de aço em baixa rotação. Neste momento, foi realizado um ponto de sutura na porção externa de cada um dos fragmentos a fim de que, durante a inclusão, fosse identificada a superfície interna como superfície de corte, o que garantiu a contemplação da área das exodontias nos cortes histológicos.

Subseqüentemente, procedeu-se à descalcificação em solução de ácido fórmico durante 24 horas. Essa solução foi constituída por 780 ml de citrato de sódio tribásico P.A. a 10% (Cromoline, Diadema, SP, Brasil) e 220 ml de ácido fórmico P.A. a 85% (Synth, Diadema, SP, Brasil). Concluída a descalcificação, os espécimes foram processados pela técnica da parafina.

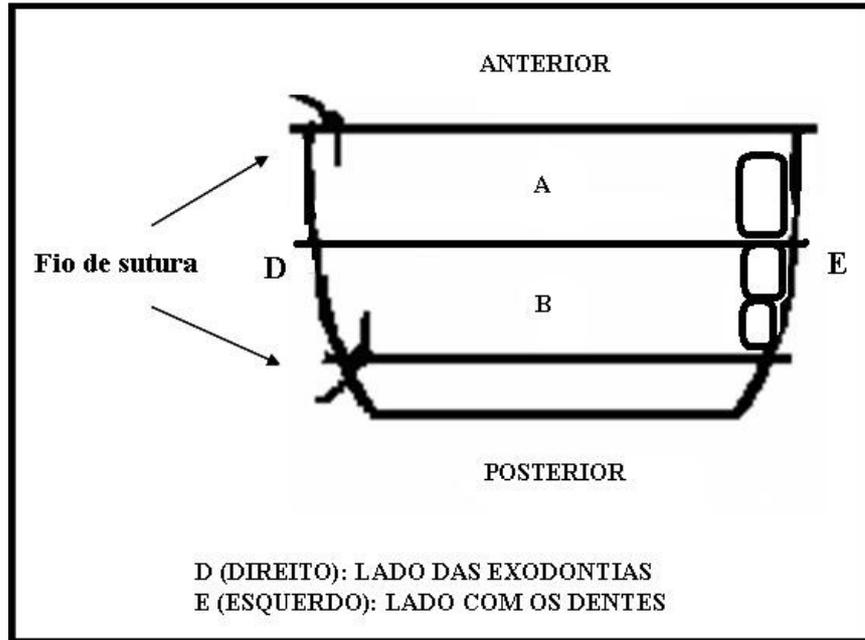


Figura 6 – Desenho esquemático do preparo do espécime para processamento histológico

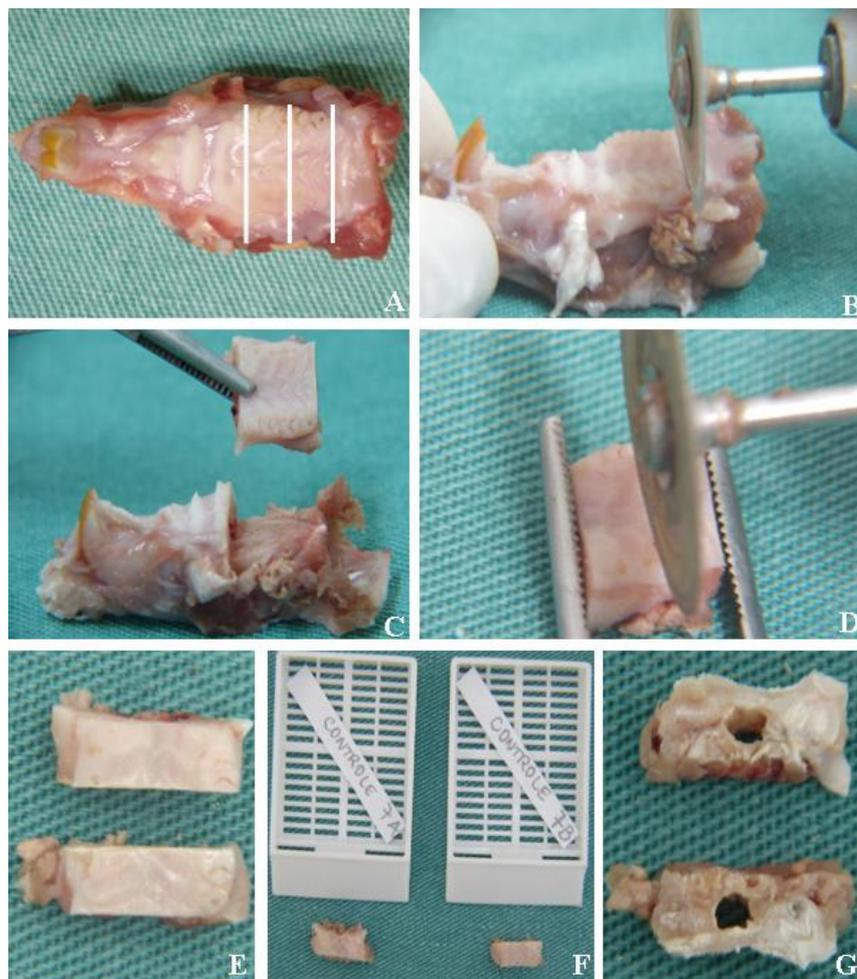


Figura 7 – Preparo do espécime para processamento histológico

4.3.6 Confeção das Lâminas Histológicas

Os espécimes foram incluídos em parafina de modo que a superfície interna do fragmento constituísse a superfície de corte, sendo a porção externa identificada por meio do ponto de sutura. A partir dos 31 animais, foram confeccionados 62 blocos, 31 deles com fragmentos A e 31, com fragmentos B. De cada bloco foram obtidos dois cortes, cada um deles com 4 µm de espessura e confeccionadas as respectivas lâminas histológicas. Uma das lâminas foi submetida à coloração por hematoxilina e eosina e a outra, a processamento imunohistoquímico. Neste, as lâminas foram submetidas à recuperação antigênica em banho-maria por 30 minutos a 99°C, utilizando tampão Tris/EDTA, pH 9 (20 mM Tris/0,65 mM EDTA). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com solução de peridrol a 3% (H₂O₂ em álcool metílico) por 30 minutos. As secções foram incubadas com anticorpo monoclonal de rato anti-VEGF (clone VG1, ZymedR Laboratories, South San Francisco, CA, USA) na diluição de 1:300. O sistema de detecção utilizado foi o Kit Dako LSAB (Dako, Carpinteria, CA, USA). Os cortes foram revelados por meio de cromógeno 3,3'-diaminoazobenzidina (DAB) e tampão PBS em solução de peróxido de hidrogênio a 0,002% e contracolorados com hematoxilina, sendo desidratados, clarificados e montados com lamínula. Como controle positivo foram empregados cortes histológicos de carcinoma de cólon, e como controle negativo, alguns cortes da amostra foram processados na ausência do anticorpo.

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A captura das imagens foi realizada por meio de microscópio óptico Zeiss Axioskop 40 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha), conectado por videocâmera Roper Scientific (Media Cybernetics, Silver Spring, USA) a um microcomputador Pentium IV 2.2 GHz com 512 MB de memória RAM, disco rígido de 160 GB e placa de captura Image Pro Capture Kit (Media Cybernetics, Silver Spring, USA). Para a análise das imagens, foi empregado o programa Image Pro Plus versão 6.0. O programa permite a captura da imagem digital com possibilidade de inserção de grade de correção, marcação e contagem das áreas de interesse. As imagens foram capturadas em objetiva de 5x e armazenadas no formato TIFF (True Image Format File). A análise histológica foi realizada por um observador calibrado e cego. A

calibração consistiu na avaliação de uma série de 20 imagens histológicas em dois momentos distintos. Os resultados da avaliação foram submetidos ao teste *t* pareado e ao teste de correlação de Pearson que evidenciaram, respectivamente, ausência de diferença significativa entre as análises ($P=1$) e forte correlação ($r=0,999$).

Nas lâminas coradas por hematoxilina e eosina foi realizada a análise quantitativa (proporção) das variáveis osteonecrose, infiltrado inflamatório, colônias microbianas, tecido epitelial, tecido conjuntivo fibroso, resto radicular e osso vital no sítio das exodontias. Em cada lâmina, foram selecionados 4 campos, de forma padronizada, de modo que contemplassem a área da exodontia (Figuras 8 e 9). Da mesma forma, foi realizada a análise quantitativa da expressão imunohistoquímica do VEGF em campo de tecido ósseo vital, na área da exodontia, que foi selecionado de forma padronizada em todas as imagens. A leitura foi realizada pelo programa Image Pro Plus 6.0, aplicando-se uma grade de 798 pontos sobre cada campo selecionado e mensurando-se cada uma das variáveis histológicas por meio da técnica de contagem manual de pontos (Figuras 10 e 11).

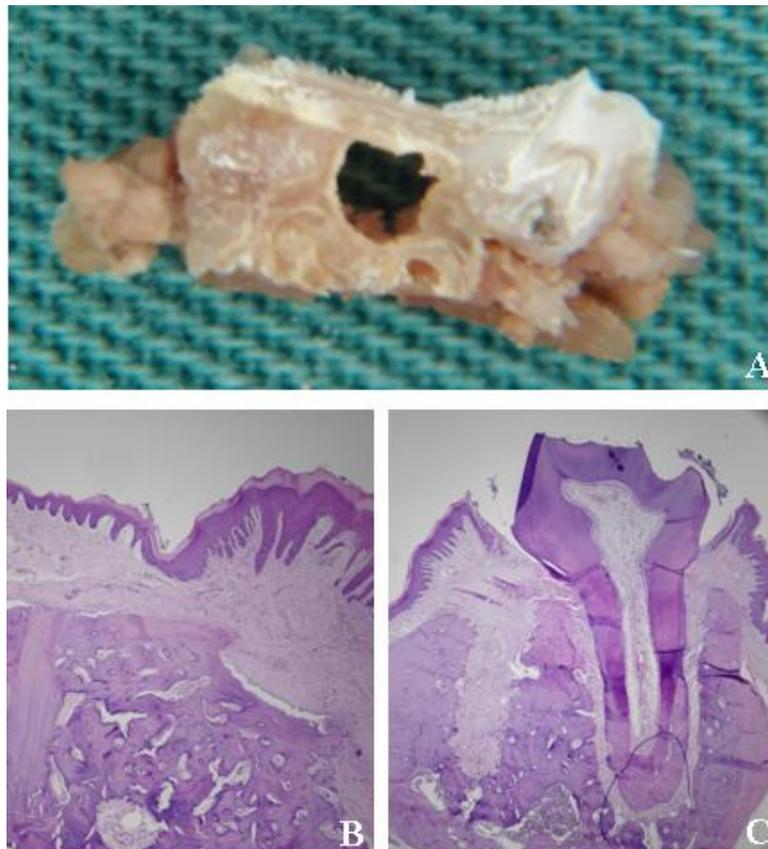


Figura 8 – Área das exodontias (lado direito) e área oposta (com dentes) contempladas tanto no espécime macroscópico (A) quanto no corte histológico (B, C). HE, aumento aproximado: 100X

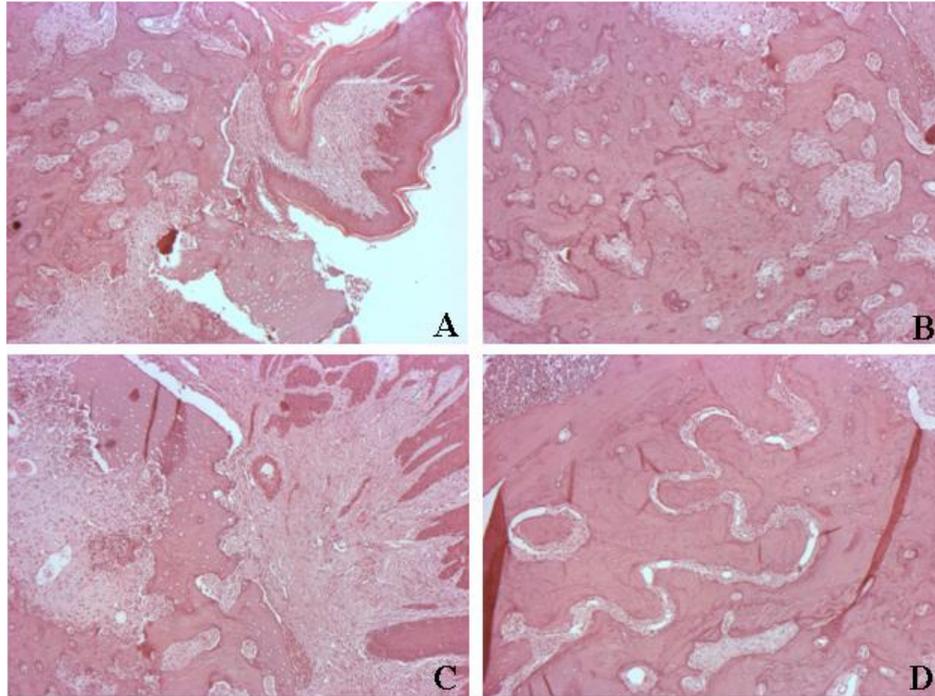


Figura 9 – Imagens capturadas no sítio das exodontias. HE, objetiva 5X

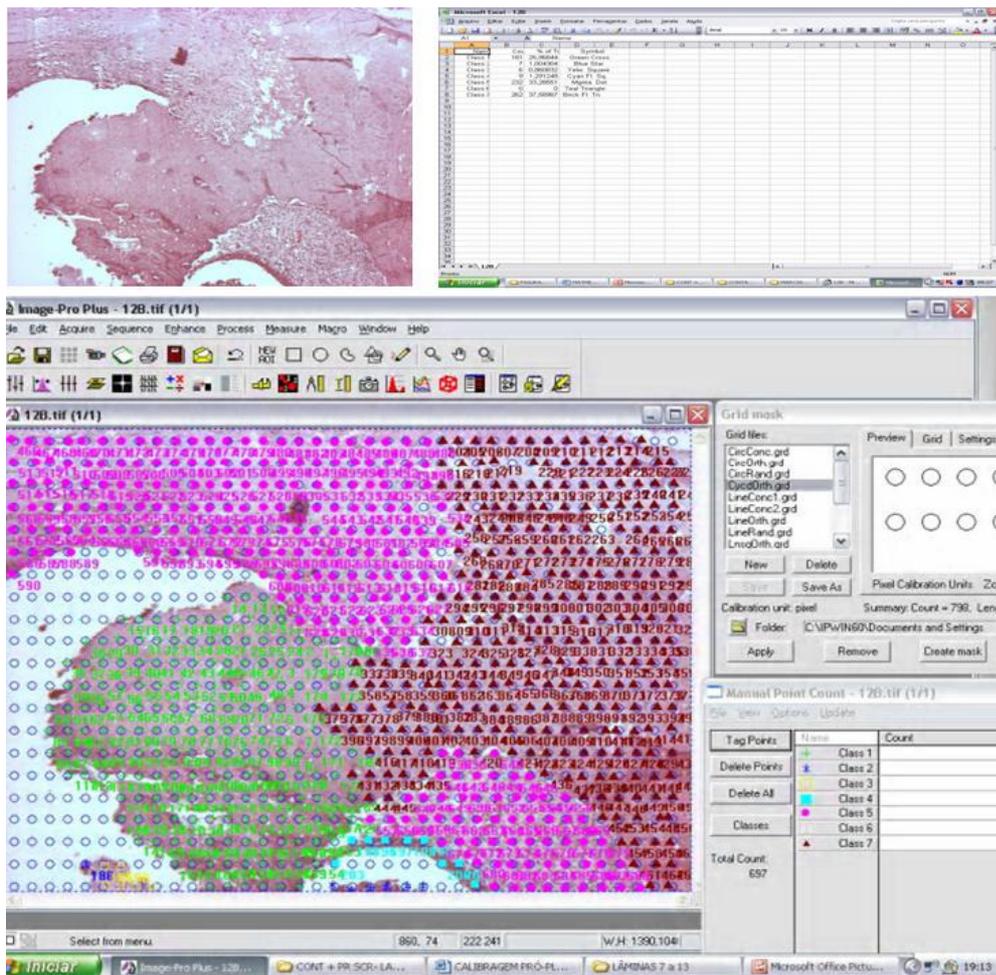


Figura 10 – Quantificação das variáveis histológicas (HE) pelo método de contagem manual de pontos

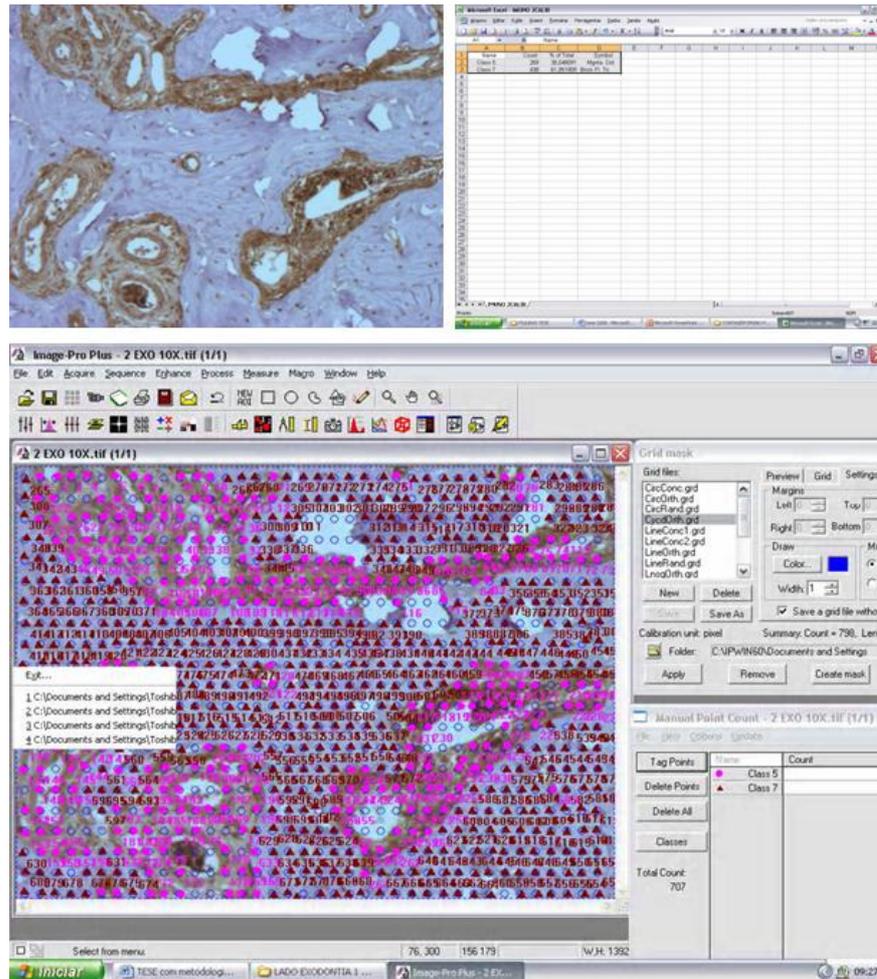


Figura 11 – Quantificação da expressão imunohistoquímica do VEGF pelo método de contagem manual de pontos

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados por meio de estatística descritiva e dos testes Kruskal-Wallis, ANOVA e qui-quadrado, ao nível de significância de 5%. Por meio dos testes, a ocorrência das variáveis solução de continuidade da mucosa, osteonecrose, osso vital, infiltrado inflamatório, colônias microbianas, tecido conjuntivo fibroso, tecido epitelial, resto radicular e expressão do VEGF foram comparadas entre os grupos alendronato, zoledronato e controle. Os testes qui-quadrado e Kruskal-Wallis foram complementados, respectivamente, pela análise de resíduos ajustados e pelo teste de comparações múltiplas.



RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

À oroscopia, realizada previamente às exodontias, nenhum animal, nos três grupos avaliados, exibiu lesão da mucosa oral.

5.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

A avaliação macroscópica, realizada após a eutanásia, evidenciou que 10 animais (100%) do grupo zoledronato exibiram solução de continuidade da mucosa, enquanto para os grupos alendronato e controle essa frequência foi, respectivamente, de 8 (72,7%) e 1 (10%). Por meio do teste do qui-quadrado (χ^2), complementado pela análise de resíduos ajustados, ao nível de significância de 5%, verificou-se que o grupo zoledronato está associado à presença de solução de continuidade, e o grupo-controle à ausência ($P < 0,001$, Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição da amostra segundo presença/ausência de solução de continuidade na mucosa oral ao exame macroscópico (área das exodontias), Porto Alegre, 2008

Grupo	Solução de Continuidade da Mucosa			
	Presente		Ausente	
	n	%	n	%
Zoledronato	10*	100,0	0	0,0
Alendronato	8	72,7	3	27,3
Controle	1	10,0	9*	90,0

$\chi^2=18,01$; $P < 0,001$

* Análise de Resíduos Ajustados: $P < 0,05$

5.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

5.3.1 Distribuição da Amostra de Acordo com as Variáveis Histológicas (HE)

A tabela 2 e a figura 12 exibem os resultados de frequência (presença/ausência) das variáveis histológicas nos grupos avaliados. No grupo zoledronato, 8 animais (80%) tiveram osteonecrose, enquanto nos grupos alendronato e controle não foi observada ocorrência dessa variável. Infiltrado inflamatório foi observado em todos os animais tanto do grupo zoledronato quanto do grupo-controle e em 7 (63,6%) do grupo alendronato. Para colônias microbianas, a frequência verificada foi de 10 (100%) no grupo zoledronato, de 4 (36,4%) no grupo alendronato e 5 (50%) no grupo-controle. Restos radiculares estavam presentes em 6 animais (60%) do grupo zoledronato, em 6 (54,5%) do alendronato e em 10 (100%) do grupo-controle. As variáveis tecido conjuntivo fibroso, tecido epitelial e osso vital estiveram presentes em todos os animais dos grupos avaliados.

Por meio do teste χ^2 complementado pela análise de resíduos ajustados, ao nível de significância de 5%, verificou-se que: (1) o grupo zoledronato está associado à presença, e os grupos alendronato e controle à ausência de osteonecrose ($P<0,001$); (2) o grupo alendronato está associado à ausência de infiltrado inflamatório ($P=0,015$); (3) o grupo zoledronato está associado à presença, e o grupo alendronato, à ausência de colônias microbianas ($P=0,008$).

Tabela 2 – Distribuição da amostra de acordo com presença/ausência das variáveis histológicas avaliadas na área das exodontias, Porto Alegre, 2008

Variáveis histológicas	Grupo										P		
	Zoledronato (n=10)				Alendronato (n=11)				Controle (n=10)				
	Presente		Ausente		Presente		Ausente		Presente			Ausente	
n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
Osteonecrose	8*	80	2	20	0	0	11*	100	0	0	10*	100	<0,001
Infiltrado inflamatório	10	100	0	0	7	63,6	4*	36,4	10	100	0	0	0,015
Colônias microbianas	10*	100	0	0	4	36,4	7*	63,6	5	50	5	50	0,008
Resto radicular	6	60	4	40	6	54,5	5	45,5	10*	100	0	0	0,047
Tecido conjuntivo fibroso	10	100	0	0	11	100	0	0	10	100	0	0	-
Tecido epitelial	10	100	0	0	11	100	0	0	10	100	0	0	-
Osso vital	10	100	0	0	11	100	0	0	10	100	0	0	-

P= nível mínimo de significância do Teste χ^2

* Análise de Resíduos Ajustados: $P < 0,05$

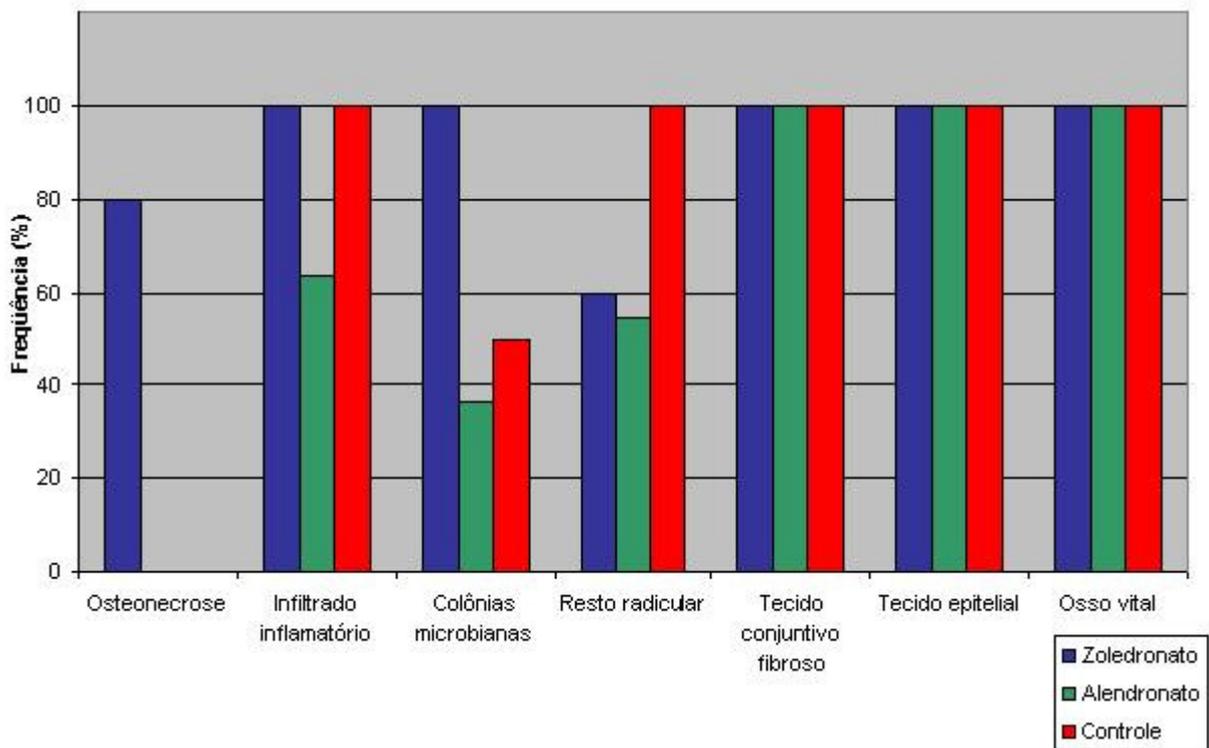


Figura 12 – Distribuição da amostra segundo a presença das variáveis histológicas avaliadas, Porto Alegre, 2008

5.3.2 Quantificação das Variáveis Histológicas na Área das Exodontias (HE)

A tabela 3 e a figura 13 exibem os resultados da quantificação das variáveis histológicas na área das exodontias nos três grupos pesquisados. Por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis complementado por seu teste de comparações múltiplas, ao nível de significância de 5%, verificou-se que, nas variáveis osteonecrose, infiltrado inflamatório e colônias microbianas, o grupo zoledronato exibiu percentuais significativamente maiores do que os demais grupos. Nas variáveis tecido epitelial, tecido conjuntivo fibroso, resto radicular e osso vital, não houve diferença significativa entre os grupos avaliados.

Tabela 3 – Quantificação das variáveis histológicas (HE) na área das exodontias nos grupos zoledronato, alendronato e controle, Porto Alegre, 2008

Variáveis histológicas	Zoledronato (%)			Alendronato (%)			Controle (%)		
	Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana
Osteonecrose	10,96	11,47	7,8*	0	0	0	0	0	0
Infiltrado inflamatório	4,34	4,12	2,5*	1,27	2,11	0,7	1,18	1,78	0,6
Colônias microbianas	4,82	7,60	1,4*	0,28	0,75	0	0,26	0,54	0
Tecido epitelial	13,07	5,01	11,3	16,88	6,05	15,3	15,30	6,32	13,2
Tecido conjuntivo fibroso	30,77	5,90	31	37,68	9,36	37,9	36,70	7,67	36,3
Resto radicular	4,33	7,10	3,4	3,43	5,48	3,1	4,72	6,42	4,6
Osso vital	31,68	16,41	36,8	40,42	13,12	41,2	41,81	11,30	42,9

DP=Desvio-padrão

* Kruskal-Wallis complementado por seu teste de comparações múltiplas, $P < 0,05$

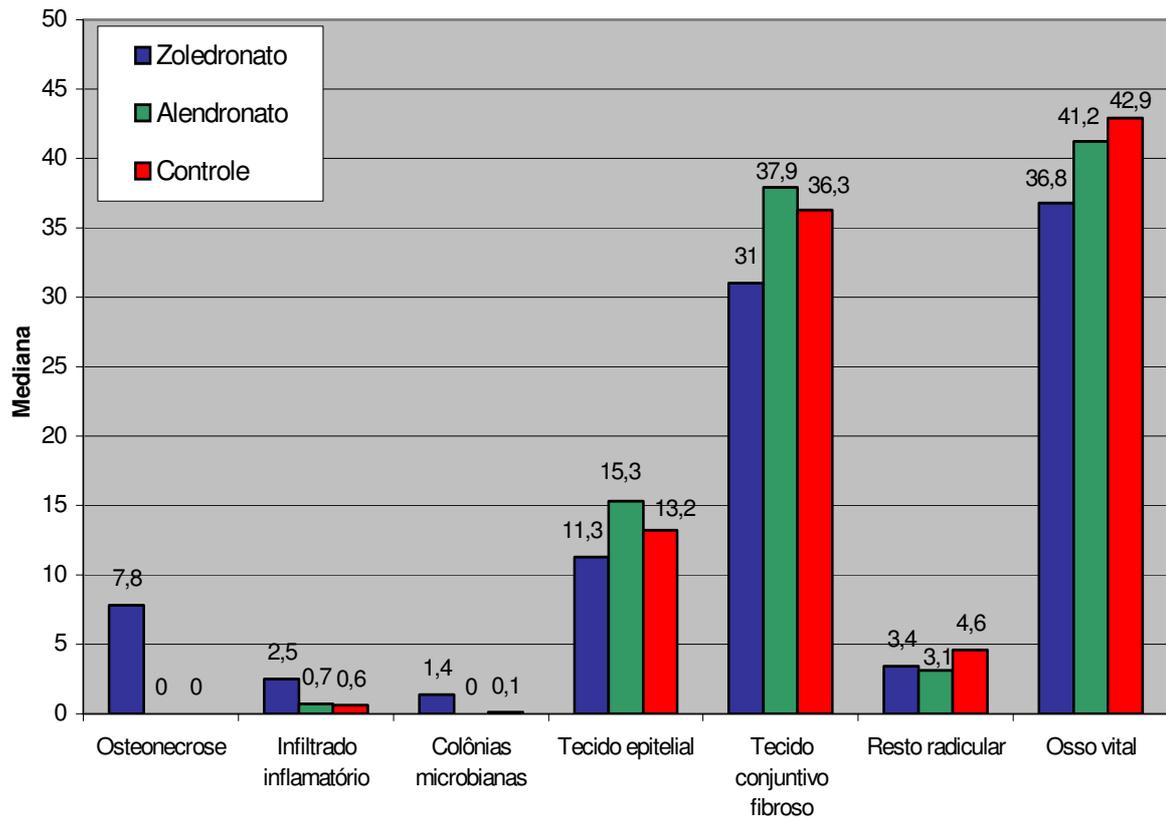


Figura 13 – Mediana das variáveis histológicas nos grupos zoledronato, alendronato e controle, Porto Alegre, 2008

5.3.3 Quantificação da Expressão Imunoistoquímica do VEGF em Área de Osso Vital

A tabela 4 exibe a proporção de expressão imunoistoquímica do VEGF em área de osso vital nos grupos zoledronato, alendronato e controle. Por meio do teste da Análise de Variância, verificou-se não haver diferença significativa da média do percentual de marcação positiva para VEGF nos diferentes grupos ($P=0,860$).

Tabela 4 – Expressão imunohistoquímica do VEGF em área de osso vital nos grupos zoledronato, alendronato e controle, Porto Alegre, 2008

Grupo	n	Expressão imunohistoquímica do VEGF (%)			
		Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
Zoledronato	10	21,79	5,84	11,59	29,90
Alendronato	11	22,36	6,27	9,83	34,60
Controle	10	23,28	6,22	15,84	32,99

ANOVA, $P=0,860$

5.3.4 Análise Descritiva (HE)

5.3.4.1 Osteonecrose

As áreas de osteonecrose identificadas ao exame histológico contemplavam fragmentos de osso não-vital, cujos osteoplastos estavam vazios, bem como colônias microbianas na periferia, nos espaços medulares e em áreas adjacentes (Figura 14). A porção de osso não-vital era contígua ao osso vital subjacente (Figura 15).

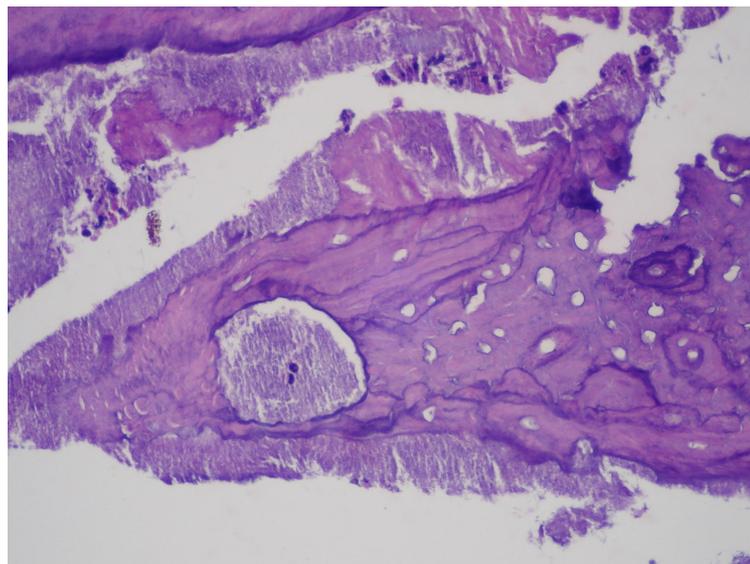


Figura 14 – Osteonecrose: osso não-vital e colônias microbianas. HE, aumento aproximado: 200X

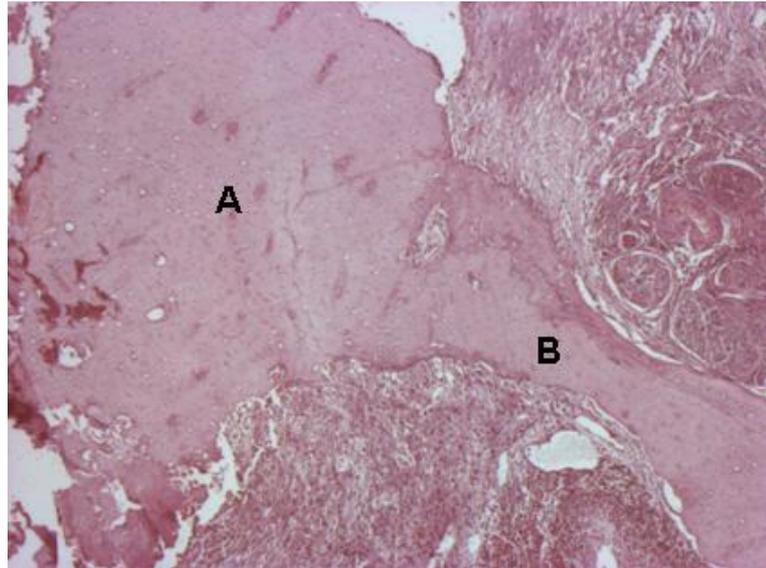


Figura 15 – Osso não-vital (A) contíguo ao osso vital (B). HE aumento aproximado: 100X

5.3.4.2 Colônias Microbianas

As imagens microscópicas de colônias microbianas eram, em sua maioria, morfológicamente compatíveis com *Actinomyces* sp. (Figura 16).

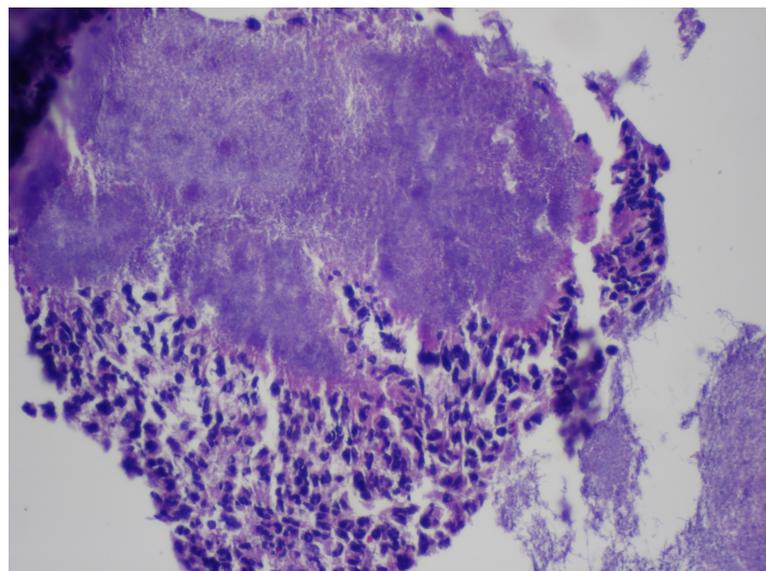


Figura 16 – Colônias microbianas compatíveis com *Actinomyces* sp. e infiltrado inflamatório. HE, aumento aproximado: 400X

5.3.4.3 Infiltrado Inflamatório

Nas áreas de osteonecrose, além de linfócitos e plasmócitos, houve intenso infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos próximos às colônias microbianas (Figura 17). Nas áreas próximas aos restos radiculares, que foram observados em todos os grupos pesquisados, o infiltrado inflamatório foi composto por linfócitos, plasmócitos, polimorfonucleares neutrófilos e, em alguns espécimes, células gigantes multinucleadas e formação de granuloma (Figura 18).

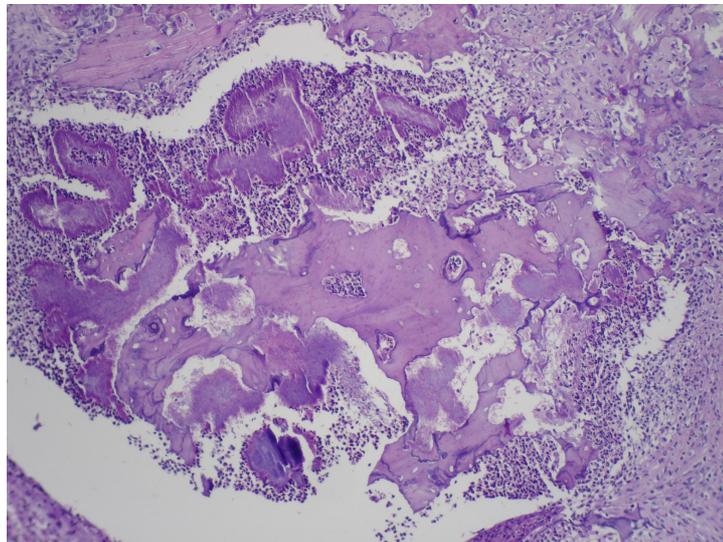


Figura 17 – Osteonecrose, colônias microbianas e infiltrado inflamatório. HE, aumento aproximado: 200X

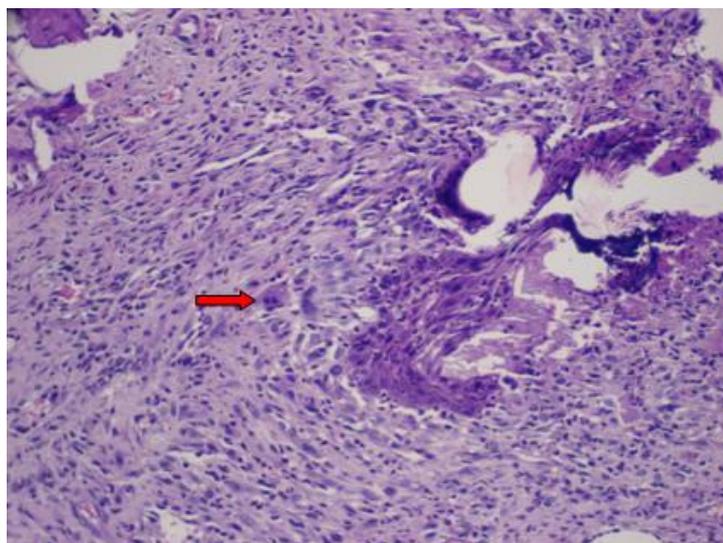


Figura 18 – Infiltrado inflamatório (áreas próximas aos restos radiculares): linfócitos, plasmócitos e células gigantes multinucleadas (seta). HE, aumento aproximado: 400X

5.3.4.4 Reparo Cicatricial

Nos espécimes em que se observou reparo cicatricial da ferida exodôntica sem ocorrência de osteonecrose, o mesmo ocorreu às expensas de tecido conjuntivo fibroso e osso vital. A mucosa de revestimento suprajacente exibiu epitélio pavimentoso estratificado ceratinizado (Figura 19).

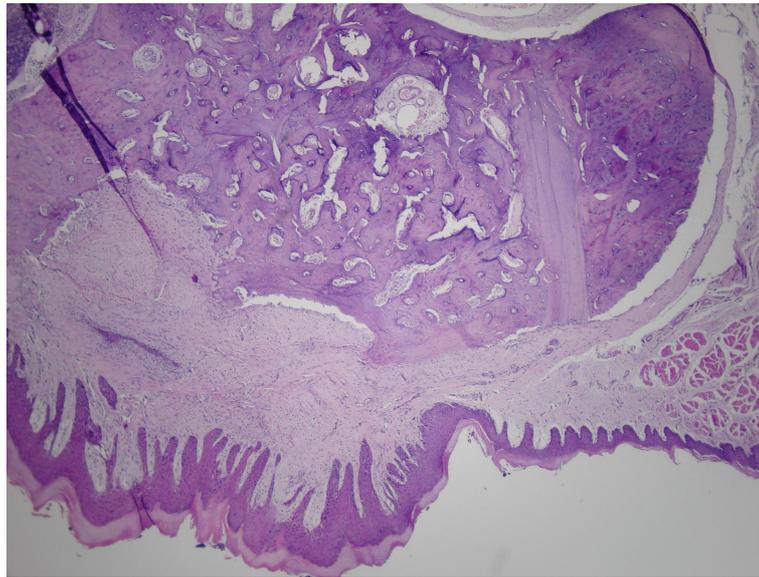


Figura 19 – Reparo cicatricial: osso vital, tecido conjuntivo fibroso e revestimento por epitélio pavimentoso estratificado ceratinizado. HE, aumento aproximado: 100X



DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A verificação de que nenhum animal nos três grupos avaliados, zoledronato, alendronato e controle, exibiu lesão de mucosa oral previamente às exodontias respalda a idéia de que as lesões detectadas posteriormente estejam, de fato, associadas ao procedimento cirúrgico e ao uso dos bisfosfonatos, e não a outros fatores locais ou sistêmicos. A macroscopia após a eutanásia, por sua vez, revelou que todos os animais do grupo zoledronato exibiam solução de continuidade da mucosa, enquanto, nos grupos alendronato e controle, essa frequência foi, respectivamente, oito e um. Ao considerar-se que no grupo zoledronato oito animais exibiram osteonecrose ao exame histológico, justifica-se a presença da solução de continuidade, já que, nas áreas de osteonecrose, a mucosa é incapaz de epitelizar e coaptar as margens da ferida (LANDESBURG et al., 2008). O questionamento seria: qual a causa da solução de continuidade ao exame macroscópico em dois animais do grupo zoledronato que não exibiram osteonecrose ao exame microscópico? Talvez a osteonecrose estivesse presente, mas não foi contemplada pelo corte histológico. Talvez, de fato, os animais não tivessem osteonecrose, mas a cicatrização dos tecidos moles, da mesma forma, foi comprometida, já que, ao exame microscópico, colônias microbianas estavam presentes em todos os animais do grupo em questão, bem como restos radiculares fraturados durante a exodontia. Isso parece plausível, uma vez que o fato repetiu-se no grupo alendronato, em que, embora nenhum animal tivesse exibido osteonecrose à microscopia, oito tiveram solução de continuidade da mucosa à macroscopia. É preciso acrescentar a essa conjectura o achado de que, no grupo-controle, um animal exibiu solução de continuidade da mucosa, enquanto todos eles tiveram restos radiculares e cinco tiveram colônias microbianas. Ou seja, mesmo exibindo as variáveis resto radicular e colônias microbianas em frequência semelhante aos grupos zoledronato e alendronato, o grupo-controle não teve a mesma frequência de solução de continuidade da mucosa. Haveria algum efeito, direto ou indireto, sobre os tecidos moles exercido pelos bisfosfonatos que pudesse justificar esse achado?

Efeitos adversos incomuns como aumento dos níveis séricos de creatinina, fadiga, artralgia, náusea, complicações gastrintestinais e hipocalcemia são relatados (DIEGO et al., 2007; DIMITRAKOPOULOS et al., 2006; MIGLIORATI et al., 2005). Ainda, os bisfosfonatos nitrogenados causam dano à mucosa gástrica, como infiltração de neutrófilos independentemente da ação sobre a microvasculatura, efeito associado ao uso tópico que sugere propriedades irritantes da droga (WALLACE et al., 1999). Entretanto, o aspecto mais

importante a ser considerado é o fato de existirem indícios de que esses compostos inibem os ceratinócitos envolvidos na cicatrização da mucosa oral, retardando-a, o que pode ter papel significativo na iniciação da osteonecrose dos maxilares, pois não está bem claro se esta lesão inicia na mucosa oral ou deriva do osso subjacente. Dosagens de pamidronato similares às dosagens terapêuticas empregadas na rotina clínica são tóxicas às células epiteliais *in vitro*. A droga induz as células à perda de adesividade, evento que sugere a possibilidade de indução de necrose (LANDESBURG et al., 2008). Tais fatos permitem sugerir o uso do bisfosfonato como possível fator responsável pela elevada prevalência de solução de continuidade da mucosa oral no grupo alendronato.

A osteonecrose foi o foco do presente estudo e foi verificada, ao exame microscópico, em 80% dos animais do grupo zoledronato e em nenhum animal dos grupos alendronato e controle. Tal achado confirma a associação entre osteonecrose e o uso do zoledronato já verificada em estudos clínicos (MARX, 2003; MIGLIORATI, 2003; MIGLIORATI et al., 2005; PURCELL; BOYD, 2005; RUGGIERO et al., 2004). Ainda, torna evidente que o uso do fármaco associado ao trauma provocado pela exodontia constitui condição suficiente para a ocorrência da osteonecrose, sem que esta dependa de fatores de risco ou de co-morbidades como já sugerido em alguns estudos (MARX et al., 2005; PURCELL; BOYD, 2005; SCHWARTZ, 1982).

No grupo alendronato, nenhum animal exibiu osteonecrose, a despeito da presença de restos radiculares, processo inflamatório, colônias microbianas e solução de continuidade da mucosa. Tal achado excluiria a possibilidade de este fármaco estar associado à osteonecrose? É preciso considerar alguns fatores importantes, já que há relatos na literatura de pacientes que desenvolveram osteonecrose dos ossos maxilares com o uso de alendronato (MARX 2003; MIGLIORATI, 2003; MIGLIORATI et al., 2005; NASE; SUZUKI, 2006; PURCELL; BOYD, 2005; RUGGIERO et al., 2004). A menor absorção da droga por via oral (FARIAS, 2005; GERTZ et al., 1991; LIN et al., 1991) pode ser apontada como uma justificativa para tal fato. Além disso, a presença, em sua estrutura química, de dois átomos de nitrogênio em um anel heterocíclico, torna o zoledronato mais potente que o alendronato (RESZKA, 2004). O zoledronato exibe potência aproximadamente 20 vezes superior à do alendronato (FERNANDES et al., 2005; FERREIRA JUNIOR et al., 2007; NEVES et al., 2003). Assim, exerce efeitos sobre o tecido ósseo e sobre a angiogênese mais precocemente que o alendronato podendo, inclusive, afetar a angiogênese de tecidos não mineralizados (WOOD et al., 2002). Os bisfosfonatos nitrogenados de administração intravenosa, portanto, representam

risco maior de osteonecrose do que os de administração oral, como já relatado por outros pesquisadores (FARRUGIA et al., 2006; PURCELL; BOYD, 2005).

Os fatores tempo de uso e dosagem do alendronato podem estar associados ao fato de nenhum animal ter desenvolvido osteonecrose neste grupo. Há relatos de que períodos de até três anos de uso desse fármaco estão isentos de associação com lesão e que, somente depois de decorrido tal prazo, o alendronato passaria a representar risco para o desenvolvimento de osteonecrose (AMERICAN ASSOCIATION OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGEONS, 2007; MARX et al., 2005). Ou seja, a manutenção dos animais sob terapia com alendronato durante tempo superior ao que foi estabelecido na presente pesquisa poderia resultar em achados diferentes. Por outro lado, segundo Araújo (2007), cerca de 25 meses de vida do rato correspondem a 70 anos de vida em humanos. Ao considerar-se essa proporção, o prazo de três anos em humanos para que o alendronato passe a representar risco de osteonecrose corresponderia a 30 dias no rato. No presente estudo, as exodontias foram realizadas 45 dias após o início da administração do fármaco, e os animais foram mantidos sob terapia durante cinco meses, o que representaria aproximadamente 15 anos em humanos. Sendo assim, do ponto de vista teórico, o tempo de administração do alendronato aos animais estaria adequado. Entretanto, é preciso considerar que esse é um cálculo aproximado, bem como o fato de que fatores metabólicos específicos do indivíduo interferem na resposta às drogas. Talvez, um período mais prolongado de administração do alendronato previamente às exodontias fosse capaz de surtir resultados diferentes. Por outro lado, há evidência de que estudos em modelos animais com até um mês de duração identificam 90% dos efeitos tóxicos (GREAVES et al., 2004), o que respalda a idéia de que o tempo de tratamento empregado na presente pesquisa estaria adequado.

Outro aspecto a considerar é a dosagem de alendronato empregada na presente pesquisa. Foram administrados 0,05mg/kg, uma vez por semana para cada animal por 23 semanas. A dosagem foi estabelecida considerando-se DL/DE (dose letal/dose equivalente) que seria 5 µg/kg/dia, o que equivale a 0,035 mg/kg/semana (HUANG et al., 2005). Embora esse cálculo já tivesse considerado o fato de que a eliminação da droga é mais rápida em ratos do que em humanos (MORRIS, 1999), optou-se por elevá-la a 0,05mg/kg/semana, uma vez que algumas pesquisas aplicaram dosagens superiores de alendronato por via oral (LEHMAN JUNIOR et al., 2004; PINTO et al., 2006). É possível que dosagens ainda maiores tivessem sido capazes de induzir lesões, tanto osteonecrose quanto lesões de outra natureza, ou até mesmo a morte dos animais. Entretanto, optou-se pela dosagem de 0,05mg/kg/semana, com o objetivo de reproduzir nos modelos animais a situação clínica vivenciada pelos pacientes. Ou

seja, a dosagem ideal a ser empregada para os animais seria aquela equivalente a 1 mg/kg/semana por via oral, que é a dosagem terapêutica empregada em humanos (HUANG et al., 2005). Pesquisas que investiguem o efeito de diferentes dosagens de alendronato no reparo de feridas exodônticas, incluindo dosagens superiores às empregadas no presente estudo, poderiam gerar informações mais elucidativas sobre esse tópico.

Há suspeitas de que fumo (AMERICAN ASSOCIATION OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGEONS, 2007), uso crônico de álcool (AGARWALA et al., 2002; AMERICAN ASSOCIATION OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGEONS, 2007), diabetes mellitus (MIGLIORATI et al., 2005), hipoproteinemia (CARTER et al., 2005), corticoterapia, quimioterapia (HELLSTEIN; MAREK, 2005; PURCELL; BOYD, 2005; RUGGIERO et al., 2004; SCHWARTZ, 1982; TARASSOFF; CSERMAK, 2003; WYNGAERT et al., 2006), terapia imunossupressora (AGARWALA et al., 2002; PURCELL; BOYD, 2005), lesões endodônticas, doença periodontal, abscessos (MARX et al., 2005), higiene oral deficiente (AMERICAN ASSOCIATION OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGEONS, 2007) e insuficiência renal seriam co-fatores no desenvolvimento da osteonecrose por bisfosfonatos (NASE; SUZUKI, 2006). É preciso considerar, portanto, que, no caso do alendronato, sendo este menos potente que o zoledronato, os co-fatores poderiam exercer papel fundamental no desenvolvimento da osteonecrose. Estudos que investiguem essa possibilidade tornam-se pertinentes, já que a monitorização de co-fatores passíveis de serem controlados (fumo, álcool, diabete, uso de corticosteróides, saúde bucal precária) seria uma forma de prevenir a lesão, ou mesmo, esses co-fatores constituiriam contra-indicação ao uso dos bisfosfonatos.

O fato de animais nos grupos controle e alendronato também terem exibido restos radiculares e não terem desenvolvido osteonecrose reafirma a associação entre esta e o zoledronato. Além disso, tal achado corrobora os relatos de que os bisfosfonatos de administração intravenosa representam risco maior de osteonecrose do que os de administração oral (FARRUGIA et al., 2006; PURCELL; BOYD, 2005).

A alta frequência de microrganismos no grupo zoledronato resultou dos eventos de osteonecrose que acometeram esse grupo. O grupo alendronato não exibiu casos de osteonecrose, mas teve a ocorrência de fatores predisponentes ao processo infeccioso como solução de continuidade na mucosa e restos radiculares. Entretanto, a despeito desses fatores, o grupo exibiu frequência de colônias microbianas significativamente menor que a verificada para o grupo zoledronato e também menor que a do grupo-controle. Muitos aspectos do mecanismo de ação dessas drogas ainda estão por ser esclarecidos (BAGAN et al., 2005;

RUGGIERO et al., 2004). Há relatos de sua atividade sobre o metabolismo de vários protozoários e, por isso, poderiam ser empregados no tratamento da doença de Chagas, leishmaniose visceral, malária e toxoplasmose. Nessas situações, o mecanismo de ação dos bisfosfonatos consistiria na inibição da formação de proteínas de importância vital para esses parasitas (FERNANDES et al., 2005). O pamidronato e o risedronato inibem a TcHPRT (enzima transferase de purinas de *Trypanosoma cruzi*) (FERNÁNDEZ, 2003). Também foi verificado que alguns bisfosfonatos bloqueiam enzimas usadas pelas bactérias para trocar genes e adquirir ou propagar a sua resistência a antibióticos, efeito que já foi demonstrado em *Escherichia coli* (LEON et al., 2006).

Na presente pesquisa, não foi verificada diferença significativa da expressão imunohistoquímica do VEGF entre os grupos zoledronato, alendronato e controle. A ausência de diferença significativa para expressão de VEGF entre o grupo-controle e ambos os grupos-teste sugere que as drogas avaliadas não induzam inibição da angiogênese e que não seria este o fator associado à osteonecrose observada nos animais do grupo zoledronato. Tal achado não parece estar em consonância com os relatos da literatura de que um dos efeitos dos bisfosfonatos seja a inibição da angiogênese.

Embora o mecanismo de ação dos bisfosfonatos ainda seja pobremente conhecido (BAGAN et al., 2005; RUGGIERO et al., 2004), algumas pesquisas demonstram seu efeito sobre a angiogênese (FOURNIER et al., 2002; KAPITOLA et al., 2000; WOOD et al., 2002). O zoledronato é capaz de inibir, *in vitro*, a proliferação de células endoteliais humanas estimuladas com soro fetal bovino, fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e VEGF (WOOD et al., 2002), bem como reduzir a proliferação, induzir apoptose e diminuir a formação de tubos capilares, *in vitro*, quando empregados no tratamento de células endoteliais (FOURNIER et al., 2002). O alendronato reduz a neoangiogênese intratumoral, mas não altera a expressão imunohistoquímica do VEGF, efeito que resulta, em parte, da ação antiangiogênica diretamente nas células endoteliais intratumorais por inibição da geranilgeranilação do Rho (HASHIMOTO, 2007), GTPase importante na manutenção da integridade do citoesqueleto e tráfego de vesículas nas células (VANCONCELLOS et al., 2004). Tal relato poderia justificar a ausência de diferença de expressão imunohistoquímica do VEGF entre os grupos alendronato e controle. Entretanto, não explica esse mesmo achado para o grupo zoledronato.

O campo eleito para avaliação imunohistoquímica correspondeu ao osso vital presente na região das exodontias, a despeito de o espécime exibir ou não osteonecrose. Tal escolha foi embasada no fato de que os bisfosfonatos têm afinidade pelo tecido ósseo em sítios de

metabolismo ativo, onde atingem concentrações terapêuticas (FLEISCH, 2002). Além disso, o VEGF aumenta com a hipóxia, e a angiogênese ocorre em situações fisiológicas específicas, como a consolidação de fraturas (SIVAKUMAR et al., 2004). O reparo cicatricial da ferida exodôntica também constitui processo de maior atividade metabólica (CALIXTO et al., 2001; ZIED et al., 2005), o que faz pensar que requeira aumento da angiogênese. No rato, é comum o processo de cicatrização, em sua fase final, decorridas seis semanas após exodontias, apresentar aumento progressivo de trabéculas ósseas maduras e diminuição do volume de tecido conjuntivo (CALIXTO et al., 2001; ZIED et al., 2005). Entretanto, em alguns animais do presente estudo, o reparo cicatricial formou mais tecido conjuntivo fibroso do que osso. Teria o osso avaliado a mesma exigência metabólica que o tecido conjuntivo presente na área das exodontias? Estaria mais indicado avaliar-se a expressão do VEGF no tecido conjuntivo ou mesmo no soro desses animais, como realizado em outros estudos (SANTINI et al., 2002, 2003)? Seriam esses os aspectos que explicariam a ausência de diferença significativa da expressão imunohistoquímica do VEGF em osso vital entre os três grupos? Ainda, sabendo-se que a maior exigência metabólica ocorre na fase inicial do processo cicatricial (CALIXTO et al., 2001; ZIED et al., 2005), é preciso considerar se a avaliação do VEGF não deveria ter ocorrido em um período mais precoce, logo após as exodontias.

Por outro lado, há autores que defendem a idéia de que a inibição da angiogênese *in vivo* por parte dos bisfosfonatos não está definitivamente comprovada, uma vez que a maioria dos relatos do efeito antiangiogênico provêm de estudos *in vitro* ou com modelos animais transgênicos (LANDESBURG et al., 2008; SANTINI et al., 2002; WOOD et al., 2002). O presente estudo foi realizado em ratos Wistar e presume-se que a resposta por parte desses modelos animais, salvo restrições inerentes às peculiaridades da espécie, simule a situação em humanos. No modelo animal empregado, não foi observada diferença de expressão imunohistoquímica do VEGF em osso vital entre os grupos alendronato, zoledronato e controle. Ou seja, o resultado está em consonância com Landesberg et al. (2008) que argumentam que o efeito antiangiogênico dos bisfosfonatos *in vivo* não é comprovado. Pampu et al. (2008), por sua vez, observaram, em estudo histomorfométrico por HE, aumento, e não diminuição, de vasos sanguíneos no tecido ósseo de coelhos tratados com zoledronato.

O termo angiogênese foi empregado por John Hunter em 1787 para nomear o crescimento de novos vasos (GUPTA; ZHANG, 2005). Existem cerca de 40 indutores e inibidores endógenos da angiogênese (POON et al., 2003), porém o VEGF é o fator pró-angiogênico predominante (SHWEIKI et al., 1992). Estudos têm demonstrado que a expressão do VEGF é fortemente dependente de células endoteliais de vasos neoformados,

mas não de vasos pré-existentes em tumores (BENJAMIN et al., 1999). Os anticorpos anti-CD31, anti-CD34, anti-CD105 e anti-FVIII (anti-fator VIII) são os mais empregados para marcação de vasos em imunohistoquímica (VERMEULEN et al., 2002), mas o VEGF também é bastante aplicado (GLEICH et al., 1997). O anti-FVIII tem a capacidade de identificar vasos maduros e imaturos (LAITAKARI et al., 2004). O anti-CD105 parece ser um marcador promissor, porém poucos estudos utilizam-no (VERMEULEN et al., 2002). Uma vez que os bisfosfonatos são apontados como inibidores da angiogênese, a expressão do VEGF estaria bem indicada no presente estudo. Por outro lado, diante das especificidades e indicações de cada um desses anticorpos, também se faz necessário analisar a pertinência de testes que comparem a expressão de distintos marcadores de angiogênese, inclusive por meio de outros métodos além da imunohistoquímica, principalmente ao avaliar-se o alendronato.

O critério imunohistoquímico de positividade para o VEGF corresponde a grânulos marrons em células endoteliais vasculares (VOLM et al., 1997), entretanto, a expressão também pode ocorrer em citoplasma de fibroblastos (FREITAS et al., 2005). Considerando este possível viés, no presente estudo a avaliação da expressão do VEGF empregou como critério de positividade não apenas a marcação de cor marrom, mas também a morfologia da estrutura histológica marcada. Ainda, a padronização dos mesmos critérios de positividade aplicados aos três grupos estudados subsidia a confiabilidade das avaliações.

O advento dos bisfosfonatos ao cenário da área biomédica tem configurado um paradoxo. Ao mesmo tempo em que representaria a solução para condições patológicas cuja característica principal é a reabsorção óssea, esse grupo de drogas também traz consigo um novo problema a resolver, que é a osteonecrose, bem como outros possíveis efeitos indesejáveis ainda desconhecidos. O risco da osteonecrose maxilar de fato existe, e o uso racional desses fármacos requer a ponderação entre gravidade da doença, condições clínicas do paciente, potência do fármaco e adequação do uso. A intensificação das pesquisas na busca de respostas a tantos aspectos ainda obscuros viabilizará a racionalização do uso da droga. Nesse ínterim, cautela parece ser o caminho mais adequado, e a adequação bucal prévia ao início da terapia torna-se indispensável.



CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Os resultados da presente pesquisa permitem estabelecer as seguintes conclusões:

- a) A administração do bisfosfonato nitrogenado zoledronato por via parenteral está associada à osteonecrose dos maxilares e é condição suficiente para que esta ocorra em indivíduos submetidos a exodontias.
- b) O bisfosfonato nitrogenado alendronato administrado por via oral não constitui condição suficiente para a ocorrência de osteonecrose maxilar em indivíduos submetidos a exodontias.
- c) A administração de bisfosfonato nitrogenado por via oral (alendronato) ou parenteral (zoledronato) não está associada à diminuição da expressão imunoistoquímica do VEGF em tecido ósseo vital na área das exodontias.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADAMSON, B. B. et al. Mineralisation defects with pamidronate therapy for Paget's disease. **Lancet**, London, v. 342, n. 8885, p. 1459-1460, Dec. 1993.

AGARWALA, S. et al. Alendronate in the treatment of avascular necrosis of the hip. **Rheumatology**, New York, v. 41, n. 3, p. 346-347, Mar. 2002.

ALTUNDAL, H.; GURSOY, B. The influence of alendronate on bone formation after autogenous free bone grafting in rats. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, St. Louis, v. 99, n. 3, p. 285-291, Mar. 2005.

AMERICAN ASSOCIATION OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGEONS (AAOMS). Position paper on bisphosphonate: related osteonecrosis of the jaws. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 65, n. 3, p. 369-376, Mar. 2007.

ARAÚJO, A. L. Correlação entre dieta lipídica poliinsaturada e aterogênese. **Revista de Angiologia e Cirurgia Vascular**, Rio de Janeiro, n. 5, p. 15-22, set./out. 2007.

ASTRAND, J.; ASPENBERG, P. Systemic alendronate prevents resorption of necrotic bone during revascularization: a bone chamber study in rats. **BMC Musculoskelet Disord**, London, v. 3, p. 19, Aug. 2002. Disponível em: <<http://www.Biomedcentral.com>>. Acesso em: 05 nov. 2005.

BADROS, A. et al. Osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma patients: clinical features and risk factors. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 24, n. 6, p. 945-952, Feb. 2006.

BAGAN, J. V. et al. Avascular jaw osteonecrosis in association with cancer chemotherapy: series of 10 cases. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, Copenhagen, v. 34, n. 2, p. 120-123, Feb. 2005.

BARRIOS GONZÁLEZ, E.; GARCÍA NIETO, V. Uso de bisfosfonatos en la infancia. **Boletín de la Sociedad Canaria de Pediatría**, v. 29, n. 2, p. 7-12, May/Aug. 2005.

BENJAMIN, L. E.; GOLIJANIN, D.; ITIN, A. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumor follows vascular endothelial growth factor withdrawal. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 103, n. 2, p. 159-165, Jan. 1999.

BERENSON, J. R. et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guidelines: the role of bisphosphonates in multiple myeloma. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 20, n. 17, p. 3719- 3736, Sept. 2002.

BERTÈ, R. et al. Jaw avascular bone necrosis associated with long-term use of bisphosphonates. **Tumori**, Milano, v. 92, n. 4, p. 361, July/Aug. 2006.

BODY, J. J. Clinical research update zoledronate. **Cancer**, New York, v. 80, n. 8 supl., p. 1699-1701, Oct.1997.

BROOKS, J. K. et al. Osteonecrosis of the jaws associated with use of risedronate: Report of 2 new cases. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, St. Louis, v. 103, n. 6, p. 780-786, June 2007.

BROWN, J. E.; COLEMAN, R. E. The present and future role of bisphosphonates in the management of patients with breast cancer. **Breast Cancer Research**, London, v. 4, n. 1, p. 24-29, 2002.

CALIXTO, R. F. E. et al. Implante de um floclado de resina de mamona em alvéolo dental de rato. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 257-262, jul./set. 2001.

CAMPBELL, D. T.; STANLEY, J. C. **Delineamentos experimentais e quase experimentais de pesquisa**. São Paulo: EPU, 1979.

CAPSONI, F.; LONGHI, M.; WEINSTEIN, R. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: the rheumatologist's role. **Arthritis Research & Therapy**, London, v. 8, n. 5, p. 219, 2006.

CARTER, G.; GOSS, A. N.; DOECKE, C. Bisphosphonates and avascular necrosis of the jaw: a possible association. **The Medical Journal of Australia**, Sidney, v. 182, n. 8, p. 413-415, Apr. 2005.

CLOSE, B. et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: part 1. **Laboratory Animals**, New York, v. 30, n. 4, p. 293-316, Oct. 1996.

_____. Recommendations for euthanasia of experimental animals: part 2. **Laboratory Animals**, New York, v. 31, n. 1, p. 1-32, Jan. 1997.

COLEMAN, R. E. Optimizing treatment of bone metastases by Aredia[®] and Zometa[®]. **Breast Cancer Research**, London, v. 7, n. 4, p. 361-369, 2000.

COLLIN, P.; GUENTHER, H. L.; FLEISCH, H. Constitutive expression of osteoclast-stimulating activity by normal clonal osteoblast-like cells: effects of parathyroid hormone and 1,25=Dihydroxyvitamin D3*. **Endocrinology**, Springfield, v. 131, n. 3, p. 1181-1187, Sept. 1992.

DIEGO, R. et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws: a therapeutic dilemma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, St. Louis, v. 103, n. 3, p. e1-e5, Mar. 2007.

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**, Copenhagen, v. 35, n. 7, p. 588-593, July 2006.

ESTEFANIA FRESCO, R.; PONTE FERNÁNDEZ, N.; AGUIRRE URIZAR, J. M. Bisphosphonates and oral pathology II. osteonecrosis of the jaws: review of the literature before 2005. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, Valencia, v. 11, n. 6, p. 456-61, Nov. 2006.

FARIAS, M. L. F. Hipercalcemia nas malignidades: aspectos clínicos, diagnósticos e terapêuticos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 49, n. 5, p. 816-824, 2005.

FARRUGIA, M. C. et al. Osteonecrosis of the Mandible or Maxilla Associated with the use of New Generation Bisphosphonates. **Laryngoscope**, Philadelphia, v. 116, n. 1, p. 115-120, Jan. 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.

FERNÁNDEZ, D. **Desarrollo de agentes antichagásicos mediante diseño racional basado en la estructura proteica**. 2003. Monografías (Licenciatura em Biotecnología) - Escuela de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de General San Martín, San Martín, 2003.

FERREIRA JUNIOR, C. D. F.; CASADO, P. L.; BARBOZA, E. S. P. Osteonecrose associada aos bifosfonatos na Odontologia. **Revista Periodontia**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 24-30, dez. 2007.

FLEISCH, H. Bisphosphonates-history and experimental basis. **Bone**, New York, v. 8, supl. 1, p. 23-28, 1987.

_____. Bisphosphonates: a new class of drugs in diseases of bone and calcium metabolism. **Recent Results Cancer Research**, Chicago, v. 116, p. 1-28, 1989.

_____. New bisphosphonates in osteoporosis. **Osteoporosis International**, London, v. 3, supl. 2, p. S15-S22, 1993.

_____. Bisphosphonates: mechanisms of action. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 19, n. 1, p. 80-100, Feb. 1998.

_____. Development of bisfosfonates. **Breast Cancer Research**, London, v. 4, p. 30-34, 2002.

FOURNIER, P. et al. Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. **Cancer Research**, Baltimore, v. 62, n. 22, p. 6538-6544, Nov. 2002.

FREITAS, T. M. C. et al. Assessment of angiogenic markers in oral hemangiomas and pyogenic granulomas. **Experimental and Molecular Pathology**, San Diego, v. 79, n. 1, p. 79-85, Aug. 2005.

GEGLER, A. et al. Bisfosfonatos e osteonecrose maxilar: revisão da literatura e relato de dois casos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 52, n. 1, p. 25-31, 2006.

GERTZ, B. J. et al. Oral bioavailability and dose proportionality of aledronate (amino hydroxyl butylidene bisphosphonate) in post-menopausal women. **Journal of Bone and Mineral Research**, Washington, v. 6, supl. 1, p. 281, 1991.

GIBBS, S. D. J. et al. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw requires early detection and intervention. **The Medical Journal of Australia**, Sidney, v. 183, n. 10, p. 549-550, Nov. 2005.

GLEICH, L. et al. Tumor angiogenesis as a prognostic indicator in T2-T4 oral cavity squamous cell carcinoma: a clinical-pathologic correlation. **Head & Neck**, New York, v. 19, n. 4, p. 276-280, July 1997.

GOFFINET, M. et al. Zoledronic acid treatment impairs protein geranyl-geranylation for biological effects in prostatic cells. **BMC Cancer**, London, v. 6, p. 60, Mar. 2006.

GRAHAM, J. W. Bisphosphonates and orthodontics: clinical implications. **Journal of Clinical Orthodontics**, Boulder, v. 40, n. 7, p. 425-428, July 2006.

GRATTON, J. P.; RAE, G. A.; CLAING, A. Different pressor and bronchoconstrictor properties of human big- endothelin- 1, 2 (1-38) and 3 in ketamine/xylazine- anaesthetized guinea- pigs. **British Journal Pharmacology**, London, v. 114, n. 3, p. 720-726, Feb. 1995.

GREAVES, P.; WILLIAMS, A.; EVE, M. First dose of potential new medicines to humans: how animals help. **Nature Reviews. Drug Discovery**, London, v. 3, n. 3, p. 226-236, Mar. 2004.

GUPTA, K.; ZHANG, J. Angiogenesis: a curse or cure? **Journal of Postgraduate Medicine**, Mumbai, v. 81, n. 954, p. 236-242, 2005.

HANSEN, T. et al. Osteonecrosis of the jaws in patients treated with bisphosphonates: histomorphologic analysis in comparison with infected osteoradionecrosis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, Copenhagen, v. 35, n. 3, p. 155-160, Mar. 2006.

HASHIMOTO, K. et al. Alendronate suppresses tumor angiogenesis by inhibiting Rho activation of endothelial cells. 2007. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 354, n. 2, p. 478-484, Mar. 2007.

HELLSTEIN, J. W.; MAREK, C. L. Bisphosphonate osteonecrosis (bis-phossy jaw): is this phossy jaw of the 21st century? **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 63, n. 5, p. 682-689, May 2005.

HEWITT, C.; FARAH. S. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a comprehensive review. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, Copenhagen, v. 36, n. 6, p. 319-328, July 2007.

HILLNER, B. E. et al. American Society of Clinical Oncology guideline on the role of bisphosphonates in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 18, n. 6, p. 1378-1391, Mar. 2000.

HUANG, R. C. et al. Alendronate inhibits spine fusion in a rat model. **Spine**, Philadelphia, v. 30, n. 22, p. 2516-22, Nov. 2005.

HUGHES, D. E. et al. Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in long-term cultures of human bone marrow. **Journal of Clinical Investigation**, Berlin, v. 83, n. 6, p. 1930-1935, June 1989.

HUGHES, D. E. et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. **Journal of Bone and Mineral Research**, Washington, v. 10, n. 10, p. 1478-1487, Oct. 1995.

IGARASHI, K.; MITANI, H.; ADACHI, H. Anchorage and retentive effects of a bisphosphonate (AHBuBP) on tooth movements in rats. **American Journal of Orthodontics Dentofacial Orthopedics**, St. Louis, v. 106, n. 3, p. 279-289, Sept. 1994.

IGARASHI, K.; MITANI, H.; SHINODA, H. Inhibitory effect of the topical administration of a bisphosphonate (risedronate) on root resorption incident to orthodontic tooth movement in rats. **Journal of Dental Research**, Washington, v. 75, n. 9, p. 1644-1649, Apr. 1996.

KAPITOLA, J. et al. Effect of growth hormone and pamidronate on bone blood flow, bone mineral and IGF-I levels in the rat. **Physiological Research**, Praha, v. 49, suppl. 1, p. 101-106, 2000.

KHAN, S. A. et al. Elimination and biochemical response to intravenous aledronate in postmenopausal osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, Washington, v. 12, n. 10, p. 1700-1707, Oct. 1997.

LAITAKARI, J.; NÄYHA, V.; STENBÄCK, F. Size, shape, structure, and direction of angiogenesis in laryngeal tumour development. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 57, n. 4, p. 394-401, Apr. 2004.

LANDESBERG, R. et al. Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 66, n. 5, p. 839-847, May 2008.

LEHENKARI, P. P. et al. Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. **Molecular Pharmacology**, Bethesda, v. 62, n. 5, p. 1255-1262, May 2002.

LEHMAN JUNIOR, R. A. et al. The effect of alendronate sodium on spinal fusion: a rabbit model. **Spine**, Philadelphia, v. 4, n. 1, p. 36-43, Jan./Feb. 2004.

LEON, A. et al. Isoprenoid biosynthesis as a drug target: bisphosphonate inhibition of *Escherichia coli* K12 growth and synergistic effects of fosmidomycin. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 49, n. 25, p. 7331-7341, Dec. 2006.

LEVIN, L. et al. Effect of topical alendronate on root resorption of dried replanted dog teeth. **Dental Traumatology**, Copenhagen, v. 17, n. 3, p. 120-126, June 2001.

LICATA, A. A. Bisphosphonate Therapy. **American Journal of the Medicine Science**, Philadelphia, v. 17, n. 1, p. 313, Jan. 1997.

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

LIN, J. H. et al. Physiological disposition of alendronate, a potent anti-osteolytic bisphosphonate, in laboratory animals. **Drug Metabolism and Disposition**, Baltimore, v. 19, n. 5, p. 926-932, Sept./Oct. 1991.

LIU, L. et al. Effects of local administration of clodronate on orthodontic tooth movement and root resorption in rats. **European Journal of Orthodontics**, Oxford, v. 26, n. 5, p. 469-473, Oct. 2004.

LOPES, D. J. Considerações éticas e legais sobre a utilização de animais em experimentação científica. **Jornal da Liga Brasileira de Epilepsia**, Porto Alegre, v. 5, p. 19-22, 1992.

MACERATA, R. ZOMETA (Ácido Zoledrônico). Formulação endovenosa. Brochura para consulta do investigador. 8. ed. 2002. 134 p.

MAIA, R. C.; VASCONCELLOS, D. V. Efeito antitumoral do zoledronato nas células das doenças linfoproliferativas crônicas. [São Paulo]: Saúde Brasil, 2004. Disponível em: <<http://www.saudebrasilnet.com.br/premios/oncologia/premio1/trabalhos/029c.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2007

MALDEN, N. J.; PAI, A. Y. Oral bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaws: three case reports. **British Dental Journal**, London, v. 203, n. 2, p. 93-97, July 2007.

MARX, R. E. Osteoradionecrosis: a new concept of its pathophysiology. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 41, n. 5, p. 283-288, May 1983.

_____. Pamidronate (Aredia®) and zoledronate (Zometa®) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 61, n. 9, p. 1115-1117, Sept. 2003.

MARX, R. E. et al. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/ osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 63, n. 11, p. 1567-1575, Nov. 2005.

McCLUNG, M. R. Bisphosphonates. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 50, n. 4, p. 735-744, ago. 2006.

McCLUNG, M. R. et al. Opposite bone remodeling effects of teriparatide and alendronate in increasing bone mass. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 165, n. 15, p. 1762-1768, Aug. 2005.

McMAHON, R. E. et al. Osteonecrosis: a multifactorial etiology. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 62, n. 7, p. 904-905, 2004.

MELO, A. C.; BASTOS, M.; BASTOS, M. R. Osteonecrose da mandíbula em paciente portador de mieloma múltiplo: patologia secundária ao uso do pamidronato. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 221-222, jul./set. 2005.

MIGLIORATI, C. A. Bisphosphonates and Oral Cavity Avascular Bone Necrosis. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 21, n. 22, p. 4253-4254, Nov. 2003.

MIGLIORATI, C. A.; CASIGLIA, J.; EPSTEIN, J. Managing the care of patients with Bisphosphonate associated osteonecrosis. **Journal of American Dental Association**, Chicago, v. 136, n. 12, p. 1658-1668, Dec. 2005.

MIRZAI, R. et al. The pathogenesis of osteonecrosis and the relationship to corticosteroids. **The Journal of Asthma**, Philadelphia, v. 36, n. 1, p. 77-95, 1999.

MORRIS, T. H. Dose estimation among species. In: LEARY, S. L. (Ed.). **Formulary for laboratory animals**. 2nd ed. Ames, IA: Iowa State; 1999. p. 3-14.

MORTENSEN, M.; LAWSON, W.; MONTAZEN, A. Osteonecrosis of the jaw associated with bisphosphonate use: presentation of seven cases and literature review. **Laryngoscope**, Philadelphia, v. 117, n. 1, p. 30-34, Jan. 2007.

MURAKAMI, H. et al. A possible mechanism of the specific action of bisphosphonates on osteoclasts: Tiludronate preferentially affects polarized osteoclasts having ruffled borders. **Bone**, New York, v. 17, n. 2, p. 137-144, Aug. 1995.

NASE, J. B.; SUZUKI, J. B. Osteonecrosis of the jaw and oral bisphosphonate treatment. **Journal of American Dental Association**, Chicago, v. 137, n. 8, p. 1115-1119, Aug. 2006.

NEVES, C. L. et al. Há espaço para o uso dos bisfosfonatos na osteodistrofia? **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 215-223, 2003.

NOVARTIS ONCOLOGY MEDICAL AFFAIRS & SERVICES. **Dear doctor**. New Jersey, Sept. 2004.

OLSON, K. B.; HELLIE, C. M.; PIENTA, K. J. Osteonecrosis of jaw in patient with hormone-refractory prostate cancer treated with zoledronic acid. **Urology**, Secausus, v. 66, n. 3, p. 658 e1- 658 e3, Sept. 2005.

OYAJOBI, B. O.; MUNDY, G. R. Mieloma. In: MORAL, J. A. R.; MACÍAS, J. G. **Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral**. Madrid: Jarpyo, 2004. p. 417-421.

PAIVA, F. P.; MAFFILI, V. V.; SANTOS, A. C. S. Curso de manipulação de animais de laboratório. Salvador, BA: FIOCRUZ, maio 2005. Disponível em: <http://www.cpqgm.fiocruz.br/arquivos/bioterio/bioterio_apostilha.pdf>. Acesso em: 27 ago. 2007.

PAMPU, A. A. et al. Histomorphometric evaluation of the effects of zoledronic acid on mandibular distraction osteogenesis in rabbits. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 66, n. 5, p. 905-910, May 2008.

PAPAPOULOS, S. E.; HAMDY, N. A.; VAN DER PLUIGIN, G. Bisphosphonates in the management of prostate carcinoma metastatic to the skeleton. **Cancer**, New York, v. 88, n. 12, p. 3047-3053, June 2000.

PINTO, A. S. et al. Efeitos de tratamento combinado de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona na osteoporose induzida com dexametasona em ratas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 99-107, jan. 2006.

PONTE FERNÁNDEZ, N.; ESTEFANIA FRESCO, R.; AGUIRRE URIZAR, J. M. Bisphosphonates and oral pathology I: general and preventive aspects. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, Valencia, v. 11, n. 5, p. E396-400, Aug. 2006.

POON, R. et al. Tissue factor expression correlates with tumor angiogenesis and invasiveness in human hepatocellular carcinoma. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 9, n. 14, p. 5339-5345, Nov. 2003.

PURCELL, P. M.; BOYD, L. W. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. **The Medical Journal of Australia**, Sidney, v. 182, n. 8, p. 417-418, Apr. 2005.

RESZKA, A. A. Mecanismos de acción e los bisfosfonatos. In: MORAL, J. A. R.; MACÍAS, J. G. **Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral**. Madrid: Jarpyo, 2004. p. 175-181.

REINHOLZ, G. G. et al. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. **Cancer Research**, Baltimore, v. 60, n. 1, p. 6001-6007, Nov. 2000.

RODAN, G. A.; FLEISCH, H. A. Bisphosphonates: Mechanisms of action. **Journal of Clinical Investigation**, Berlin, v. 97, n. 12, p. 2692-2696, June 1996.

ROGERS, M. J. et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Cancer**, New York, v. 88, n. 12 suppl., p. 2961-2978, June 2000.

RUGGIERO, S. I. et al. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 62, n. 5, p. 527-534, May 2004.

SANNA, G. et al. Bisphosphonates and jaw osteonecrosis in patients with advanced breast cancer. **Annals of Oncology**, London, v. 17, n. 10, p. 1512-1516, Oct. 2006.

SANTINI, D. et al. Pamidronate induces modifications of circulating angiogenetic factors in cancer patients. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 8, n. 5, p. 1080-1084, May 2002.

_____. Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 9, n. 8, p. 2893-2897, Aug. 2003.

SATO, M. et al. Bisphosphonate action: alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. **Journal of Clinical Investigation**, Berlin, v. 88, n. 6, p. 2095-2105, Dec. 1991.

SCHENK, R. et al. Quantitative morphometric evaluation of the inhibitory activity of new aminobisphosphonates on bone resorption in the rat. **Calcified Tissue International**, New York, v. 38, n. 6, p. 342-349, June 1986.

SCHMUTZ, J. L.; BARBAUD, A.; TRECHOT, P. Alendronate and mouth ulcers: careful interrogation of the patient to start with. **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**, Paris, v. 132, n. 11 pt.1, p. 930, Nov. 2005.

SCHWARTZ, H. C. Osteonecrosis of the jaws: A complication of cancer chemotherapy. **Head Neck & Surgery**, New York, v. 4, n. 3, p. 251-253, Jan./Feb. 1982.

SHWEIKI, D. et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. **Nature**, Basingstoke, v. 359, n. 6398, p. 843-845, Oct. 1992.

SIVAKUMAR, B.; HARRY, L. E.; PALEOLOG, E. M. Modulação da angiogênese: mais vs. menos. **The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 3, n. 1, p. 41-47, Jan. 2004.

SUZUKI, K. et al. Current topics in pharmacological research on bone metabolism: inhibitory effects of bisphosphonates on the differentiation and activity of osteoclasts. **Journal of Pharmacology Sciences**, Tokyo, v. 100, n. 3, p. 189-194, Mar. 2006.

TARASSOFF, P.; CSERMAK, K. Avascular necrosis of the jaws: risk factors in metastatic cancer patients. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 61, n. 10, p. 1115-1117, Oct. 2003.

TENENBAUM, H. C. et al. Bisphosphonates and periodontics: potential applications for regulation of bone mass in the periodontium and other therapeutic/diagnosis uses. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 73, n. 7, p. 813-822, July 2002.

VASCONCELLOS, D. V.; DUARTE, M. E. L.; MAIA, R. C. Efeito antitumoral dos bisfosfonatos: uma nova perspectiva terapêutica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 1, p. 45-54, 2004.

VASIKARAN, S. D. Bisphosphonates: an overview with special reference to alendronate. **Annals of Clinical Biochemistry**, London, v. 38, n. 6, p. 608-623, Nov. 2001.

VEINSTEIN, R. S. et al. Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. **Journal of Clinical Investigation**, Berlin, v. 109, n. 8, p. 1041-1048, Apr. 2002.

VERMEULEN, P. et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. **European Journal Cancer**, Oxford, v. 38, n. 12, p. 1564-1579, Aug. 2002.

VIERECK, V. et al. Bisphosphonates Pamidronate and Zoledronic Acid Stimulate Osteoprotegerin Production by Primary Human Osteoblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 291, n.3, p. 680–686, March 2002.

VITTÉ, C.; FLEISCH, H.; GUENTHER, H. L. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. **Endocrinology**, Springfield, v. 137, n. 6, p. 2324-2333, June 1996.

VOLM, M.; KOOMAGI, R.; METTERN, J. Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in squamous cell lung cancer. **International Journal of Cancer**, New York, v. 74, n. 1, p. 64-68, Feb. 1997.

WALLACE, J. L. et al. N-bisphosphonates cause gastric epithelial injury independent of effects on the microcirculation. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 13, n. 12, p. 1675-1682, Dec. 1999.

WALTER, C. et al. Prevalence of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw within the field of osteonecrosis. **Support Care in Cancer**, Berlin, v. 15, n. 2, p. 197-202, Feb. 2007.

WAYNFORTH, H. B.; FLECKNELL, P.A. Anaesthesia and postoperative care. In: *Experimental and surgical technique in the rat*. 2nd. ed. London: Academic, 1994. cap. 3, p. 100-125.

WILKINSON, G. S.; KUO, Y. F.; FREEMAN, J. L. Intravenous bisphosphonate therapy and inflammatory conditions or surgery of the jaw: a population-based analysis. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 99, n. 13, p. 1016-1024, July 2007.

WOO, S. B.; HELLSTEIN, J. W.; KALMAR, J. R. Systematic review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 144, n. 10, p. 753-761, May 2006.

WOOD, J. et al. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 302, n. 3, p. 1055-1061, Apr. 2002.

WYNGAERT, T. V.; HUIZING, M. T.; VERMORKEN, J. B. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: cause and effect or a post hoc fallacy? **Annals of Oncology**, London, v. 17, n. 8, p. 1197-1204, Aug. 2006.

ZIED, I. C. et al. Estudo histológico do processo de reparo alveolar em ratos após exodontia e pressão com compressa de gaze embebida em solução de peróxido de hidrogênio. **Revista Odontológica de Araçatuba**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 9-13, jan./jun. 2005.

ZUAZAGA, D. P. et al. Osteonecrosis of the jaws and bisphosphonates: report of three cases. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, Valencia, v. 11, n. 1, p. 76-79, Jan. 2006.



ANEXO A

*Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

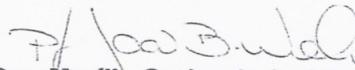
Porto Alegre 06 de junho de 2006

O Projeto de: Tese

Protocolado sob nº: 0147/05
Intitulado: Associação entre o uso de bisfosfonato e osteonecrose dos maxilares: estudo em ratos
Pesquisador Responsável: Profª. Dra. Karen Cherubini
Pesquisadores Associados: Marcia Angélica Peter Maahs, Alan Azambuja
Nível: Doutorado

Foi *aprovado* pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 02 de junho de 2006.

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEP PUCRS.



Prof. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira
 Presidente da Comissão Científica e de Ética da
 Faculdade de Odontologia da PUCRS

ANEXO B



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS



Ofício 965/06-CEP

Porto Alegre, 18 de agosto de 2006.

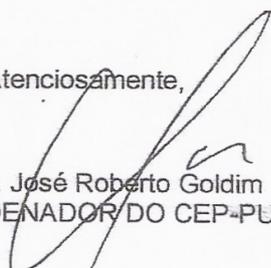
Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 06/03205, intitulado: **“Associação entre o uso de biofosfonatos e osteonecrose dos maxilares: estudo em ratos”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios parciais e final da pesquisa devem ser autorizadas a partir da presente data.

Atenciosamente,


Prof. Dr. José Roberto Goldim
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Profa Dra Karen Cherubini
N/Universidade