

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

ALESSANDRA CLÁUDIA JUNGES

AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DO FÊMUR DE RATOS
TRATADOS COM DIFERENTES BISFOSFONATOS

Porto Alegre
2013

ALESSANDRA CLÁUDIA JUNGES

AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DO FÊMUR DE RATOS
TRATADOS COM DIFERENTES BISFOSFONATOS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Odontologia da Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, como
requisito parcial para obtenção do
título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof^ª Dr^ª Deise Ponzoni

Porto Alegre
2013

CIP – Catalogação na Publicação

Junges, Alessandra Cláudia

Avaliação das características microscópicas do fêmur de ratos tratados com diferentes bisfosfonatos / Alessandra Cláudia Junges. – 2013.
35 f. il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Curso de Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

Orientadora: Deise Ponzoni

1. Bisfosfonatos. 2. Fêmur. 3. Disco epifisário. I. Ponzoni, Deise. II. Título.

Aos meus amados pais, Cláudio e Juilde, que tornaram esse sonho possível.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Cláudio e Juilde**, pelo amor verdadeiro, pela confiança depositada, pelas orações e torcida durante essa caminhada. Essa conquista é nossa.

À minha orientadora **Profa Dra Deise Ponzoni**, pela paciência, comprometimento e delicadeza, por confiar em mim e pela oportunidade de Iniciação Científica. Serei eternamente grata por todos os ensinamentos e pela amizade demonstrada.

À **Profa Dra Edela Puricelli**, referência em conduta, determinação e excelência em Odontologia.

A toda **equipe de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofaciais da FO-UFRGS** por poder fazer parte dessa família que me proporcionou grande crescimento pessoal e profissional.

Ao meu namorado, meu melhor amigo, **Bruno Benetti**, pela cumplicidade e carinho demonstrado a cada dia desde que nos conhecemos, pelos bombons escondidos que incentivaram meus estudos.

Às minhas amigas queridas, **Dessa Valim, Creta Seibt, Karen Barea De Paula, Rosi Schena, Édina Vendrame** por estarem comigo nesses 5 anos, pelos momentos de alegria, de desabafo e por toda a ajuda. Poder contar com a amizade de vocês torna a minha vida mais feliz.

Às minhas amigas de muitos anos, **Denise Stohlrck, Raquel Seibel, Paula Mazzutti, Dalvana Stohlrck**, “amigas, amigas, companheiras de uma vida”. Ao **Tomás Lenhardt e Diego Maldaner** amigos queridos há tantos anos.

Às minhas eternas colegas de pensionato, **Isis Sivinski Petry e Pricila Muller**, pela companhia diária, pelo estudo coletivo, pela nossa amizade.

À mestranda **Viviane Neves Pacheco**, pela disponibilidade e ajuda nesses anos de Iniciação Científica.

Ao eterno colega e amigo, **Cauã Vasquez Coutinho**, por ser genial, pelas brilhantes discussões nesse pouco tempo que convivemos. Até breve.

Aos **colegas do ATOFLY**, pelos 5 anos de estudo, companheirismo, alegrias, sorrisos, despedidas, perdas e a união fortalecida. Ficam as boas lembranças e a saudade.

Aos **pacientes** que confiam na FO-UFRGS, vocês completam nosso aprendizado.

A **UFRGS** pelo ensino de excelência. Espero retribuir à sociedade o conhecimento adquirido.

“Todo o fim é contemporâneo de todo o princípio”.

Agostinho Silva

RESUMO

JUNGES, Alessandra Cláudia. **Avaliação das características microscópicas do fêmur de ratos tratados com diferentes bisfosfonatos.** 2013. 35f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

Os bisfosfonatos são drogas inibidoras da atividade osteoclástica, sendo empregados no tratamento de enfermidades do metabolismo ósseo. A principal reação adversa, associada ao emprego dessa classe medicamentosa, relatada a partir de 2003, é a osteonecrose dos maxilares. Tal condição é exclusiva da maxila e mandíbula. Muitos são os estudos que objetivam compreender os mecanismos envolvidos na sua patogênese. A maioria das pesquisas *in vivo*, realizadas em modelos experimentais animais, estuda o fenômeno na região dos maxilares. Contudo, poucos são os trabalhos que avaliam o efeito dos bisfosfonatos em outras estruturas ósseas do esqueleto. Portanto, esse trabalho objetiva investigar o efeito de diferentes bisfosfonatos nitrogenados (alendronato de sódio e ácido zoledrônico), por via oral e parenteral, na cartilagem femoral, de ratos. Dezenove ratos albinos, isogênicos, cepa *Wistar*, foram distribuídos em três grupos: Grupo 01: alendronato de sódio (3mg/kg/dia); Grupo 02: ácido zoledrônico (0,2mg/kg/semana); Grupo 03: controle (sem administração de medicamentos). Esses animais foram mortos após 21 dias, os fêmures (direito e esquerdo) foram coletados, preparados e corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina para posterior avaliação histológica. No presente estudo, foi quantificada a área do disco epifisário femoral porção distal utilizando o programa Adobe Photoshop CS3 Extended®. A maior área foi observada no Grupo 03, seguida pelo Grupo 01 e Grupo 02. A análise estatística mostrou diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Sugere-se que a administração dos bisfosfonatos interfere no processo de ossificação endocondral, diminuindo a área do disco epifisário, podendo desencadear alterações no desenvolvimento ósseo.

Palavras-chave: Bisfosfonatos. Fêmur. Disco epifisário.

ABSTRACT

JUNGES, Alessandra Claudia. **Evaluation of microscopic features of the femur of rats treated with different bisphosphonates.** 2013. 35f. Final Paper (Graduation in Dentistry) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

Bisphosphonates are drugs that inhibit osteoclast activity being applied in the treatment of diseases of bone metabolism. The most important adverse reactions associated with the use of this drug class is osteonecrosis of the jaws, which are reported since 2003. This condition is exclusive of the maxilla and mandible. There are many studies that aim to understand the mechanisms involved in its pathogenesis. Most in vivo research were conducted in experimental animal models that study the phenomenon in the region of the jaws. However, there are few studies evaluating the effect of bisphosphonates in other bone structures of the skeleton. Therefore, this study aims to investigate the effects of different nitrogen bisphosphonates (alendronate sodium and zoledronic acid) orally and parenterally in the femoral cartilage in rats. Nineteen albino rats, inbred and Wistar strain were divided into three groups: Group 01: alendronate sodium (3mg/kg/day), Group 02: zoledronic acid (0.2 mg / kg / week); Group 03: control (no drug administration). These animals were killed after 21 days, the femurs (right and left) were collected, prepared and stained with hematoxylin and eosin for subsequent histological evaluation. In the present study, we quantified the area of the distal femoral epiphyseal disk using Adobe Photoshop ® CS3 Extended. The largest area was observed in Group 03, after in Group 01, and then in group 02. Statistical analysis showed significant differences between groups ($p < .05$). It suggests that the administration of bisphosphonates can reduce the area of the epiphyseal disk, which can trigger changes in bone development.

Keywords: Bisphosphonates. Femur. Epiphyseal disk.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Fêmur..... | 14 |
| Figura 2 - Lâmina fêmur..... | 15 |
| Figura 3 - Fotomicrografia da cartilagem, corada em HE..... | 17 |
| Figura 4 - Fotomicrografia da cartilagem hialina, corada em HE..... | 18 |
| Figura 5 - Fotomicrografia do disco epifisário corado com pararrosanilina e azul-de-toluidina..... | 19 |
| Figura 6 - Disco epifisário. Aumento de 400x..... | 22 |
| Figura 7 - Disco epifisário delimitado..... | 22 |
| Figura 8 - Desenho esquemático do fêmur e corte histológico do disco epifisário..... | 23 |
| Figura 9 - Área de disco epifisário de cada animal em seus grupos..... | 25 |
| Figura 10 - Fotomicrografia representativa do Grupo 01 – Alendronato de sódio..... | 26 |
| Figura 11 - Fotomicrografia representativa do Grupo 02 – Ácido Zoledrônico..... | 26 |
| Figura 12 - Fotomicrografia representativa do Grupo 03 – Controle..... | 27 |
| Figura 13 - Média da área de disco epifisário dos animais em cada grupo..... | 27 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Comparação Post-Hoc de Bonferroni. Nível de significância de 0,05..... | 28 |
|---|----|

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS..... | 11 |
| 1.1 | BISFOSFONATOS..... | 11 |
| 1.2 | ESTUDOS EXPERIMENTAIS..... | 12 |
| 1.3 | FÊMUR..... | 14 |
| 1.3.1 | Disco Epifisário..... | 15 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 20 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL..... | 20 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 20 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 21 |
| 3.1 | PARADIGMA..... | 21 |
| 3.2 | TIPO DE ESTUDO..... | 21 |
| 3.3 | LOCAL..... | 21 |
| 3.4 | DESCRIÇÃO DA AMOSTRA E PROCEDIMENTOS..... | 21 |
| 3.5 | PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO..... | 23 |
| 3.6 | CONSIDERAÇÕES ÉTICAS..... | 24 |
| 4 | RESULTADOS..... | 25 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 29 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 31 |
| | REFERÊNCIAS..... | 32 |
| | ANEXO A – TABELA MICROSOFT EXCEL ILUSTRANDO DISPOSIÇÃO DOS ANIMAIS EM TRÊS GRUPOS E SUAS MÉDIAS.... | 34 |
| | ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE, BRASIL..... | 35 |

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

A pesquisa é introduzida através da revisão de literatura pertinente ao tema.

1.1 BISFOSFONATOS

Os bisfosfonatos são drogas potentes que inibem a atividade osteoclástica, diminuem a reabsorção óssea deixando o osso resistente e com menor risco de fraturas (BAGAN et al., 2005).

Os bisfosfonatos foram sintetizados no século XIX, na Alemanha. Porém, apenas nos últimos 40 anos vêm sendo estudada a sua utilização em humanos (MAAHS et al., 2011). A *Foods and Drugs Administration* (FDA) aprovou em 1997 o uso do alendronato de sódio e, em agosto de 2001, do ácido zoledrônico (CAPELARI, 2010).

Segundo a estrutura química, podem ser divididos em dois grupos: bisfosfonatos nitrogenados e não nitrogenados. Em relação à potência, os bisfosfonatos nitrogenados são os de maior destaque, os quais acabam por desregular a membrana celular lipídica da célula clástica levando-a a apoptose (FELGUEIRAS, 2008).

Essa classe medicamentosa pode ser administrada via intravenosa ou via oral. Os bisfosfonatos intravenosos são indicados nos tratamentos de hipercalemia maligna, mieloma múltiplo, e nos diversos casos de metástases ósseas. Como exemplo de fármacos de uso intravenoso, podemos citar o ácido zoledrônico, o pamidronato e o ibandronato. Os bisfosfonatos orais são comumente empregados no tratamento da osteoporose, osteopenia e doença de Paget, destacando-se o alendronato de sódio (RUGGIERO et al., 2009).

A principal reação adversa associada ao emprego dos bisfosfonatos, que tem aumentado em progressão geométrica, é a osteonecrose dos maxilares. A condição foi descrita pela primeira vez em 2003, em uma revisão extensa que relatou 36 casos da doença (CAPELARI, 2010). Consiste na destruição do complexo vascular levando a necrose óssea. Essa patologia tem caráter progressivo e está relacionada ao uso de bisfosfonato (pregresso ou atual) quando o paciente apresentar osso exposto na região maxilo-facial por mais de oito semanas, sem histórico de radioterapia de cabeça e pescoço (FELGUEIRAS, 2008; RADHE, 2010; MAAHS et al., 2009; MAAHS et al., 2011; RUGGIERO et al., 2009; MARX et al., 2005; CAPELARI, 2010). Como consequência da infecção secundária, os tecidos podem apresentar edema, eritema, dor e supuração. As fraturas ósseas patológicas e sequestros ósseos poderão estar presentes (MAAHS et al., 2009; MAAHS et al., 2011; AGUIRRE et al., 2010).

O uso de bisfosfonatos intravenosos parece aumentar o risco para osteonecrose, em contrapartida àqueles administrados via oral (MAAHS et al., 2011).

Quanto à absorção e excreção do medicamento no organismo, a meia vida plasmática é muito curta, sendo entre 20 minutos e três horas o tempo necessário para sua eliminação. Contudo, a meia vida óssea, é muito longa podendo persistir por 10 a 12 anos, motivo pelo qual a osteonecrose pode ocorrer mesmo nos pacientes que não estão fazendo uso do medicamento no momento em que a condição se desenvolve (CAPELARI, 2010).

1.2 ESTUDOS EXPERIMENTAIS

A literatura não apresenta muitos estudos que investigam as alterações que possam ocorrer nos demais ossos, além dos maxilares, quando o indivíduo for submetido à terapia com bisfosfonatos. É desconhecido o efeito dessa classe de medicamento sobre a formação óssea. Na literatura existe a hipótese de que o medicamento além de inibir a apoptose dos osteoblastos pode induzir a sua diferenciação, aumentando a formação óssea.

Ferretti et al. (1995), reafirmam que a maior gravidade de uma doença óssea é o comprometimento das propriedades mecânicas do osso. Para tanto realizaram um estudo onde avaliaram o uso de altas doses de olpandronato de sódio em fêmur de ratos (fêmeas e machos), as doses foram de 0, 8, 40 e 200mg/kg, administradas seis dias na semana, durante 27 semanas. A maior dose (200mg/kg) provocou efeitos tóxicos e redução de crescimento, porém apresentou-se favorável nos critérios de força e rigidez, assim como a dose intermediária (40mg/kg). Os resultados obtidos mostram que altas doses do olpandronato apresentaram efeitos positivos sobre as propriedades mecânicas, aumentando a rigidez e reduzindo o risco de fraturas, do fêmur, assim como não mostrou haver prejuízo na densidade óssea.

Iwata et al. (2006), avaliaram as alterações ocorridas na formação óssea em região periosteal e endocortical, do fêmur e da tíbia, de ratos submetidos a tratamento subcutâneo com risedronato (0,05mg/kg/dia; 0,5mg/kg/dia; 5mg/kg/dia) e alendronato de sódio (0,1mg/kg/dia; 1mg/kg/dia; 10mg/kg/dia) comparado a um grupo controle (solução salina). Os autores observaram que nos animais tratados com bisfosfonatos houve redução na taxa de aposição mineral, a qual é considerada um marcador para atividade celular, bem como a inibição da atividade clástica. Porém, não encontraram alteração na formação óssea, sugerindo que o medicamento não influencia na proliferação ou diferenciação dos

osteoblastos, mas sim na atividade individual dos mesmos justificando a redução na aposição mineral.

Outro estudo que investigou alterações no fêmur e tíbia de ratos, realizado por Gasser (2005), com o objetivo de avaliar alterações nos níveis de paratormônio (PTH), tanto em ratos submetidos a uma única injeção do bisfosfonato (alendronato de sódio 200µg/kg e ácido zoledrônico 32µg/kg e 322µg/kg) como em ratos submetidos ao tratamento crônico (quatro meses) com alendronato de sódio. Os efeitos foram diferentes: os animais que sofreram apenas uma injeção do medicamento apresentaram resposta anabólica óssea normal tanto em parâmetro cortical como esponjoso, o PTH foi capaz de induzir a transformação das *bone lining cells* em células secretoras de tecido ósseo – osteoblastos. Por outro lado, a exposição crônica ao alendronato de sódio reduziu a capacidade do PTH induzir a secreção óssea.

Muitos estudos buscam explicar o papel dos bisfosfonatos no desenvolvimento da osteonecrose dos maxilares, porém essa associação ainda não foi estabelecida (MAAHS et al., 2009; BAUSS; PFISTER; PAPAPOULOS, 2008).

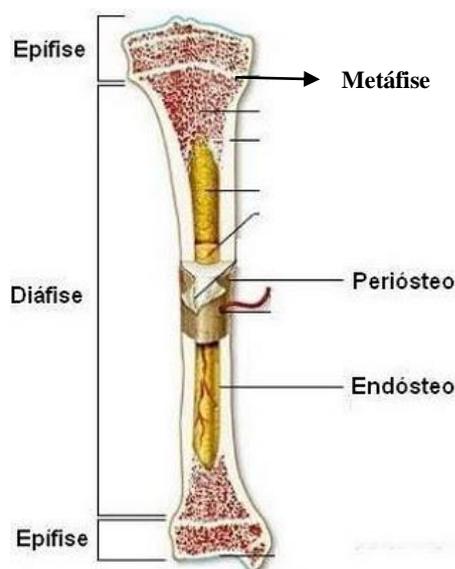
Não existem relatos na literatura da ocorrência de osteonecrose em outros ossos, além dos maxilares (MAAHS et al., 2009). Esses ossos, por possuírem dentes associados estão constantemente sofrendo forças de impacto, apresentando elevada remodelação óssea. Esse fato poderia estar relacionado à maior absorção do bisfosfonato intensificando o processo de osteonecrose (BAUSS; PFISTER; PAPAPOULOS, 2008).

Para testar essa associação, Bauss, Pfister, Papapoulos (2008), realizaram um estudo experimental a fim de comparar a absorção de um bisfosfonato nitrogenado intravenoso, o ibandronato, em diferentes ossos: mandíbula, fêmur e coluna vertebral. As doses variaram de 0,003mg/kg/dia para 0,3mg/kg/dia em injeções subcutâneas aplicadas durante nove dias. Após esse período, os animais foram mortos, as peças coletadas e corretamente armazenadas. Realizou-se a análise por espectrometria de massa de cromatografia gasosa. Os resultados demonstraram que houve semelhante absorção em todos os ossos, porém a absorção na mandíbula mostrou ser estatisticamente menor em relação aos demais ossos. Com esse resultado, não é válida a relação de absorção do medicamento com a ocorrência de osteonecrose. Os achados deste estudo corroboram com os resultados de Lin et al. (1991).

1.3 FÊMUR

O fêmur é um osso longo, cuja epífise é formada por osso esponjoso coberto por uma delgada camada de osso compacto. A diáfise é formada praticamente em sua totalidade por osso compacto, apenas na porção central, delimitando o canal medular, encontra-se osso esponjoso (Figura 1) (GARDNER, 1964; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

Figura 1 – Fêmur.



Fonte: Adaptado de INTRODUÇÃO à osteologia, 2010.

O desenvolvimento de ossos longos se dá inicialmente pela ossificação intramembranosa do pericôndrio, na porção média da diáfise. A ossificação intramembranosa é aquela que ocorre no interior de uma membrana conjuntiva, transforma o pericôndrio em periosteio, configurando o centro de ossificação primária. Essa ossificação contribui para o crescimento em espessura dos ossos longos (GARDNER, 1964; HAM, 1967; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

Após essa primeira fase, ocorre a ossificação endocondral, caracterizada pelo desenvolvimento a partir de um molde cartilaginoso. A cartilagem hialina sofre modificações, iniciando pela hipertrofia dos condrócitos, redução da matriz cartilaginosa a finos tabiques, mineralização e posterior morte dos condrócitos. Em seguida, as lacunas onde haviam condrócitos são ocupadas por capilares sanguíneos e células osteogênicas vindas do tecido conjuntivo, essas células são os osteoblastos que depositam matriz óssea sobre os tabiques calcificados. O tecido cartilaginoso serve de molde para a formação do tecido ósseo, havendo

uma substituição, portanto, os tabiques de matriz calcificada servem de apoio para ossificação. A diáfise apresenta crescimento longitudinal rápido, e o perióstio na epífise também está em crescimento. Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção no centro da cartilagem e é com isso que se forma o canal medular, que cresce longitudinalmente conforme a ossificação progride (GARDNER, 1964; HAM, 1967; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

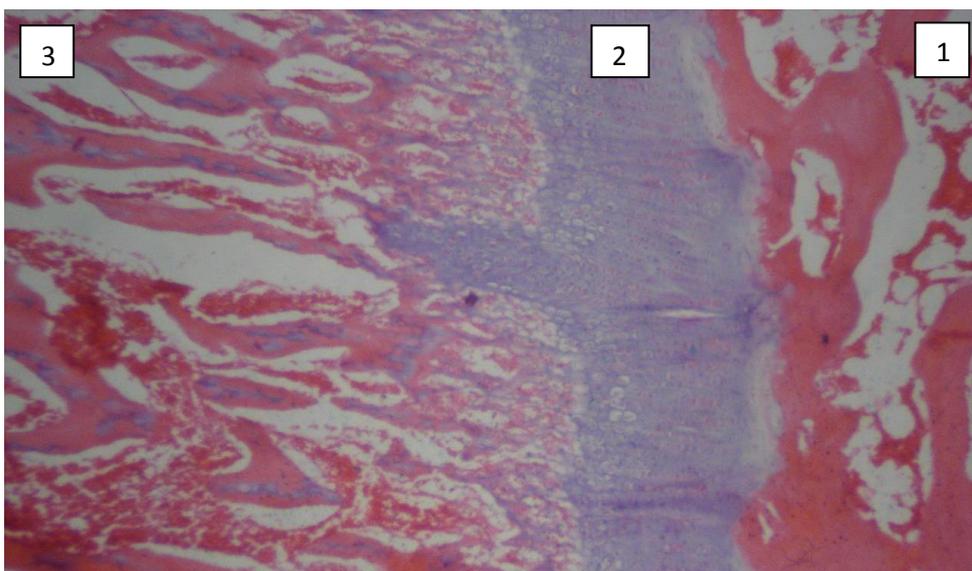
O centro de ossificação secundário surge na epífise, semelhante ao centro de ossificação primário, porém com crescimento radial (GARDNER, 1964; HAM, 1967; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

O tecido cartilaginoso se reduz a dois lugares: cartilagem articular, presente durante toda a vida do indivíduo; disco cartilaginoso (epifisário), que é responsável pelo crescimento longitudinal do osso, seu desaparecimento identifica a parada de crescimento longitudinal (HAM, 1967; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

1.3.1 Disco Epifisário

O disco epifisário é composto por cartilagem hialina. É encontrado na metafise, região entre a diáfise e epífise dos ossos longos em crescimento com a função de promover o crescimento do osso em extensão (Figura 2) (GARDNER, 1964; ROSS; REITH; ROMRELL, 1993; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Figura 2 - Lâmina fêmur.



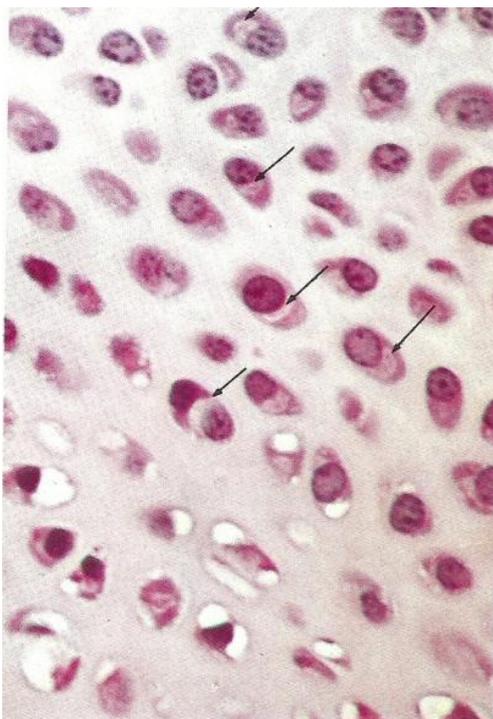
Fonte: Imagem do acervo de lâminas do Laboratório de Patologia Bucal João Jorge Diniz Barbachan da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Nota: Tecido ósseo e disco epifisário. 1) Epífise; 2) Disco epifisário; 3) Diáfise.

A cartilagem é um tecido conjuntivo de consistência rígida, porém flexível, o que caracteriza a propriedade elástica do tecido. As células presentes são os condrócitos e ao seu redor a matriz extracelular. O tecido cartilaginoso é fundamental para o crescimento dos ossos, mas, além disso, realiza função de revestimento de superfícies articulares, absorção de impactos, e facilita o deslizamento dos ossos nas articulações (GARDNER, 1964; ROSS; REITH; ROMRELL, 1993; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Para definir o tipo de cartilagem é preciso conhecer as características de sua matriz extracelular. Na cartilagem hialina, presente no disco epifisário, a matriz extracelular é vítrea, homogênea e amorfa, formada por fibrilas de colágeno tipo II associada ao ácido hialurônico, proteoglicanos muito hidratados e glicoproteínas. O colágeno não se distingue, em colorações comuns, pois seu índice de refração é muito semelhante ao das macromoléculas pelas quais está envolvido. Cada molécula de proteoglicanos irradia numerosas moléculas curtas de glicosaminoglicanos sulfatados que formam um arcabouço macromolecular da matriz junto às fibras de colágeno e ao ácido hialurônico. As proteoglicanas coram-se com corantes básicos e com hematoxilina, a basofilia observada informa a distribuição de proteoglicanas sulfatadas, e, isso ocorre, principalmente, em torno da lacuna. A quantidade de proteoglicanas diminui à medida que a cartilagem envelhece. A matriz de cartilagem que está para ser substituída por material ósseo fica impregnada por sais de cálcio que são receptivos a hematoxilina. As lacunas aumentadas (espaços brancos) onde os condrócitos ficaram fora correspondem ao momento da hipertrofia dos condrócitos, evento necessário para calcificação da matriz (Figura 3) (GARDNER, 1964; HAM, 1967; ROSS; REITH; ROMRELL, 1993; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Figura 3 - Fotomicrografia da cartilagem, corada em HE.



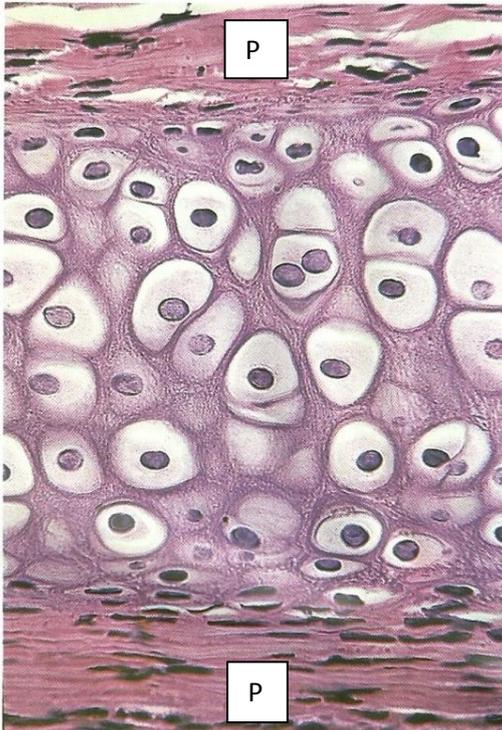
Fonte: ROSS; REITH; ROMRELL, 1993.

Nota: A basofilia presente indica tratar-se de uma cartilagem jovem. As setas representam a área do aparelho de Golgi.

As células e a matriz cartilaginosa sofrem retração durante o processamento histológico, ficando afastados da cápsula, como foi possível visualizar na Figura 4. Os condrócitos, quando corados com hematoxilina e eosina, apresentam distorção, pois contém glicogênio e lipídios que são perdidos na preparação. Nas células ativas, o citoplasma apresenta áreas de basofilia (síntese protéica) e áreas claras (aparelho Golgi). Nas células velhas, o aparelho de Golgi está reduzido, o glicogênio e lipídios são vistos em áreas mais claras (ROSS; REITH; ROMRELL, 1993; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O pericôndrio, por sua vez, é um tecido conjuntivo muito rico em fibras colágenas que além de realizar a função de nutrição é responsável pela formação de condroblastos, está ilustrado acima, na Figura 4 (HAM, 1967; ROSS; REITH; ROMRELL, 1993; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Figura 4 - Fotomicrografia da cartilagem hialina, corada em HE.



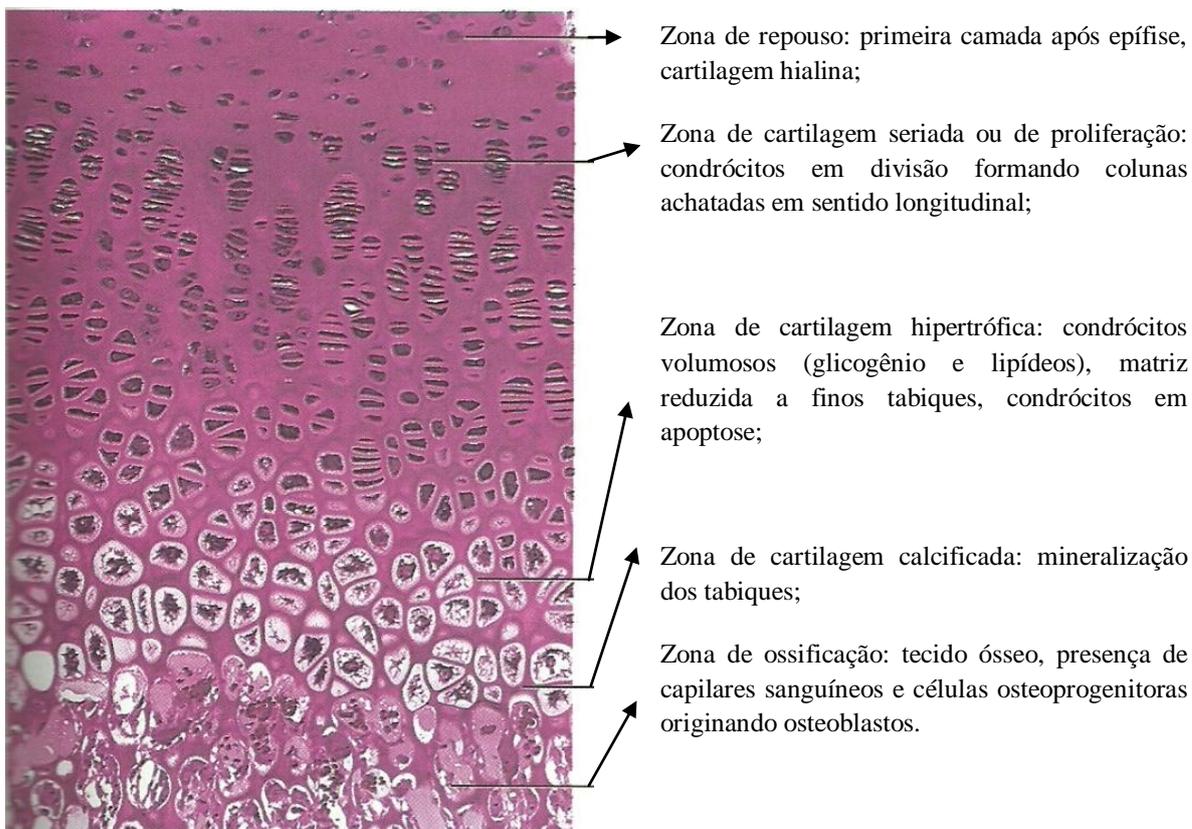
Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008.

Nota: Condrócitos estão situados nas lacunas de matriz. A letra “P” indica o pericôndrio.

A cartilagem hialina do disco epifisário é o esqueleto inicial do feto. Enquanto ocorre ossificação endocondral essa cartilagem atua como placa de crescimento epifisário (GARDNER, 1964; ROSS; REITH; ROMRELL, 1993).

A cartilagem de conjugação ou disco epifisário é responsável pelo crescimento longitudinal do osso e, portanto, está presente até a parada desse crescimento (em torno dos 20 anos de idade), seguem as camadas na Figura 5 (GARDNER, 1964; ROSS; REITH; ROMRELL, 1993; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008):

Figura 5 - Fotomicrografia do disco epifisário corado com pararrosanilina e azul-de-toluidina.



Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008.

Nota: Possível visualizar as cinco zonas e as alterações na cartilagem que dão origem ao tecido ósseo.

Tendo em vista a escassez de estudos que observam o desenvolvimento dos ossos longos em animais submetidos à terapia com bisfosfonatos, este estudo se propõe a investigar as alterações ocorridas no fêmur de ratos tratados com dois bisfosfonatos nitrogenados, por meio da mensuração da área do disco epifisário.

2 OBJETIVOS

Os objetivos são apresentados de forma estruturada, em geral e específicos.

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo propõe-se a avaliar as características microscópicas do fêmur de ratos tratados com diferentes bisfosfonatos nitrogenados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Mensurar e comparar as áreas do disco epifisário de fêmures de ratos nos diferentes grupos:

- Grupo 01: alendronato de sódio (3mg/kg/dia);
- Grupo 02: ácido zoledrônico (0,2mg/kg/semana);
- Grupo 03: controle (sem administração de medicamentos).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia da pesquisa é descrita referindo o paradigma, caracterizando o tipo de estudo realizado, local de execução da parte experimental e processamento do material biológico.

3.1 PARADIGMA

Este trabalho foi desenvolvido dentro do paradigma tradicional, quantitativo e descritivo.

3.2 TIPO DE ESTUDO

O presente estudo fez o aproveitamento de material biológico (19 ratos), oriundos da pesquisa intitulada “Características histológicas do tecido ósseo de ratos tratados com diferentes dosagens de bisfosfonatos nitrogenados: estudo piloto”. A participação nas atividades da pesquisa (período experimental e de processamento do material biológico) como Bolsista de Iniciação Científica (PIBIC – CNPq), vinculada ao projeto, correspondeu ao período de agosto de 2010 a julho de 2012.

3.3 LOCAL

O experimento com os animais foi realizado na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em Porto Alegre, RS, Brasil. As análises microscópicas das lâminas foram realizadas no Laboratório de Patologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3.4 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA E PROCEDIMENTOS

Estudo experimental *in vivo*, cego, controlado em modelo animal. A amostra foi selecionada de forma aleatória ou probabilística simples - randomizada.

A amostra para este estudo foi de 19 ratos albinos, isogênicos, da espécie *Rattus norvegicus albinus*, cepa *Wistar*, machos, com idade média de 120 dias e peso médio de

300g, provenientes da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os ratos foram agrupados da seguinte forma:

Grupo 01: alendronato de sódio (3mg/kg/dia) composto por sete animais;

Grupo 02: ácido zoledrônico (0,2mg/kg/semana) composto por sete animais;

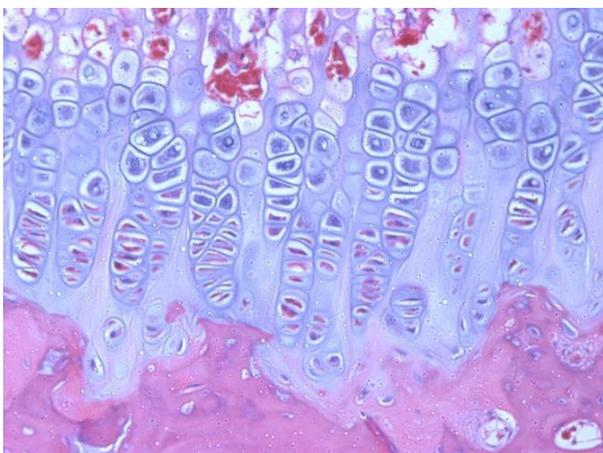
Grupo 03: controle (sem administração de medicamentos) composto por cinco animais.

Os animais do grupo 01 foram submetidos à gavagem oral, diariamente, para administração do alendronato de sódio. Os animais do grupo 02 receberam, semanalmente, ácido zoledrônico, via intraperitoneal. E, os do grupo 03 não receberam intervenção medicamentosa. Os animais do grupo 01 e 02 receberam a medicação por 21 dias. Após esse período os animais foram mortos e as peças (fêmur direito e esquerdo) foram coletadas.

Após a remoção das peças, estas foram fixadas e conservadas em formalina neutra tamponada 10%, por 48 horas, descalcificadas em ácido nítrico 10%, durante sete dias, preparadas e coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) para a avaliação histológica.

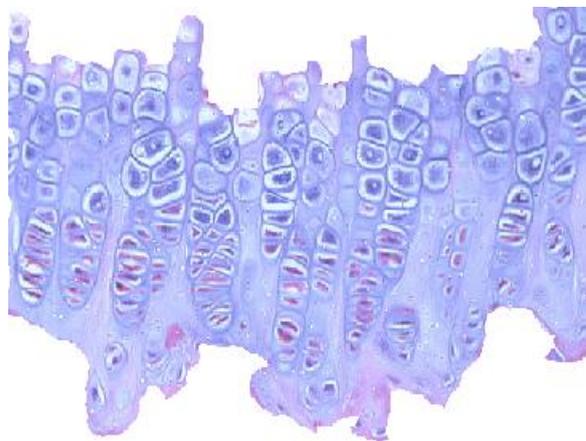
As imagens foram capturadas com auxílio do software Qcapture® da região do disco epifisário do fêmur porção distal, direito e esquerdo, com aumento de 400x. Nesse aumento foi possível observar todas as áreas analisadas (disco epifisário) nos diferentes grupos. Para a mensuração da área da cartilagem foi utilizado o programa Adobe Photoshop CS3 extended. Após identificação, a área do disco cartilaginoso foi delimitada e gerou uma medida em pixel², para isso foi utilizado uma ferramenta do próprio programa. Seguem abaixo, duas imagens histológicas, ilustrando a área que foi capturada (Figura 6) e a delimitação da área que foi mensurada (Figura 7).

Figura 6 - Disco epifisário (aumento de 400x).



Fonte: Dados da pesquisa.

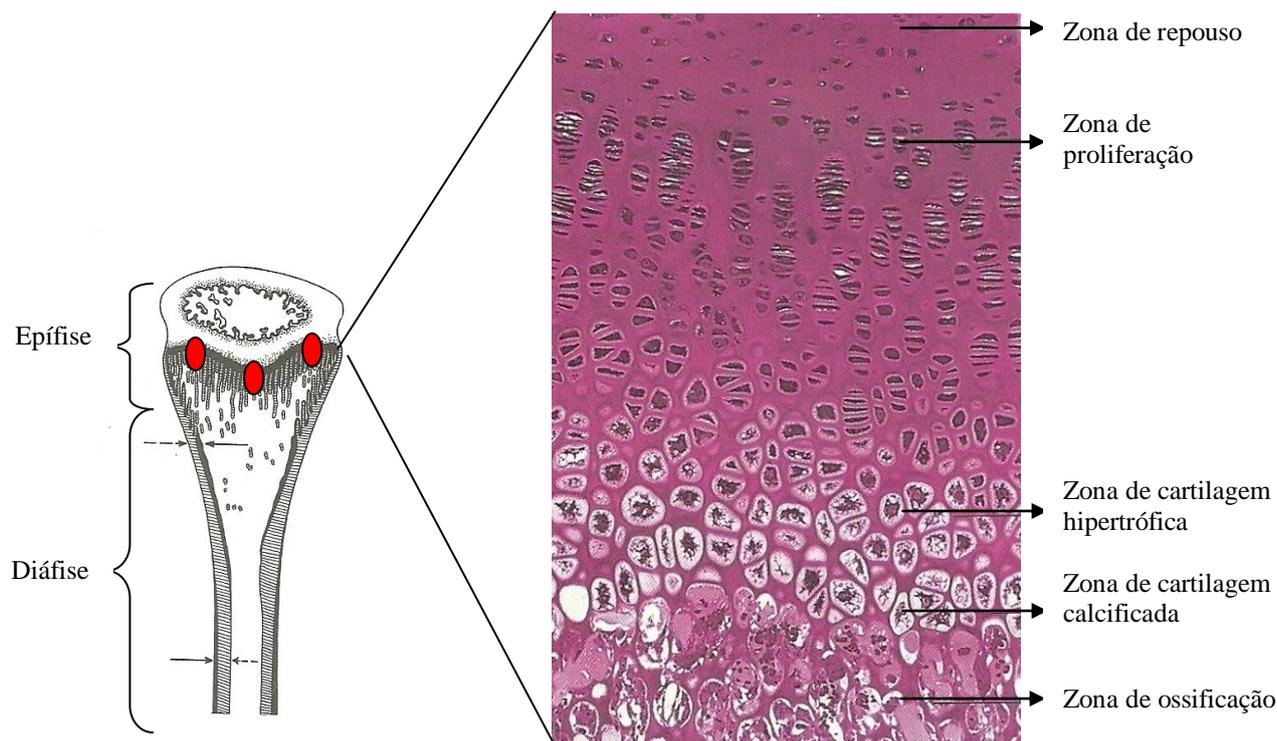
Figura 7 - Disco epifisário delimitado.



Fonte: Dados da pesquisa.

Cada animal originou duas lâminas, correspondentes ao fêmur direito e esquerdo. Em cada lâmina foram selecionadas três áreas (indicadas em vermelho na Figura 8), que foram capturadas e mensuradas. Portanto, cada animal, gerou seis medidas de área. Para fins de análise, foi considerada a média das áreas para cada animal (ANEXO A). As medidas de área foram comparadas entre os diferentes grupos.

Figura 8 – Desenho esquemático do fêmur e corte histológico do disco epifisário.



Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995, 2008.

3.5 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico SPSS for Windows versão 19.0. Foi feito o teste de Kruskal-Wallis para comparação da distribuição dos grupos pela variável. Realizou-se a análise de Generalized Estimating Equations comparando os grupos. Foi feita a comparação Post-Hoc de Bonferroni. O nível de significância usado foi de 0,05.

3.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

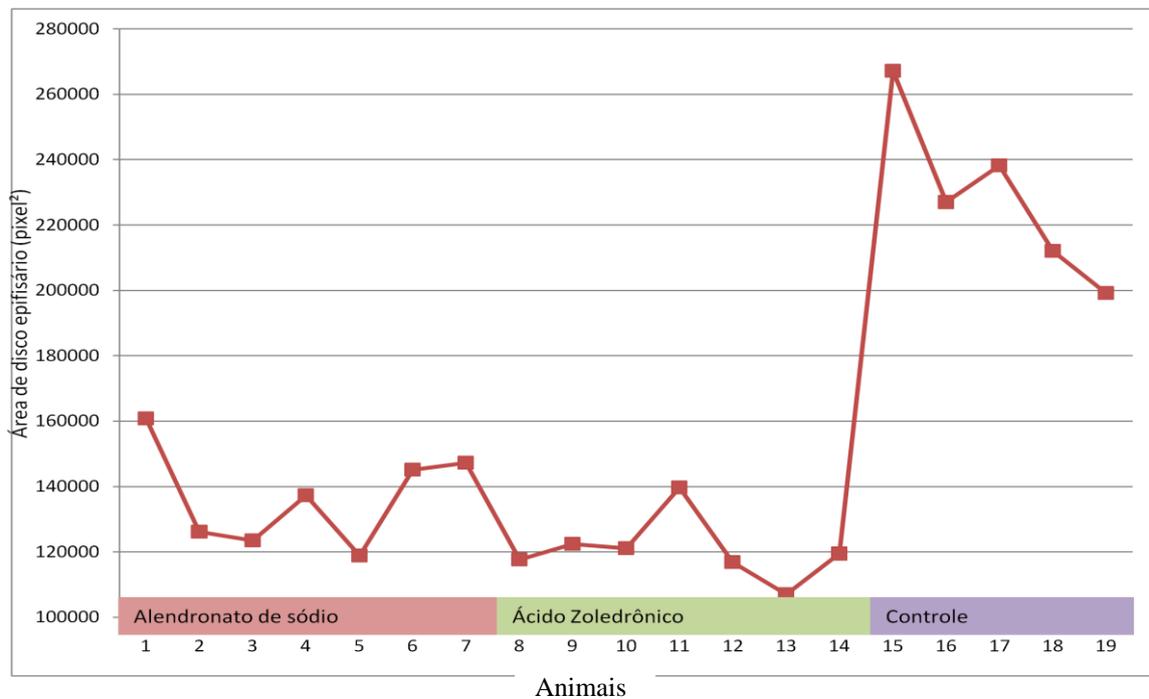
Esse estudo realizou o aproveitamento de material biológico da pesquisa intitulada “Características histológicas do tecido ósseo de ratos tratados com diferentes dosagens de bisfosfonatos nitrogenados: estudo piloto”, projeto desenvolvido no HCPA, protocolado sob o nº 09-366, que seguiu as normas de utilização de animais em projetos de pesquisa, conforme Resolução Normativa 04/97, da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA. O referido projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil (ANEXO B).

4 RESULTADOS

O estudo fez a avaliação de 38 lâminas correspondentes aos 19 ratos (fêmur direito e esquerdo). Em cada lâmina foram delimitadas três regiões de mensuração, originando seis medidas de área de disco epifisário para cada animal. Dessas seis medidas foi obtida uma média para fins de comparação.

A figura a seguir, ilustra a média de cada rato. Pode-se perceber que os animais mantêm médias de área de disco epifisário semelhante dentro de seu grupo, porém ao ser comparados com os outros dois grupos há diferença.

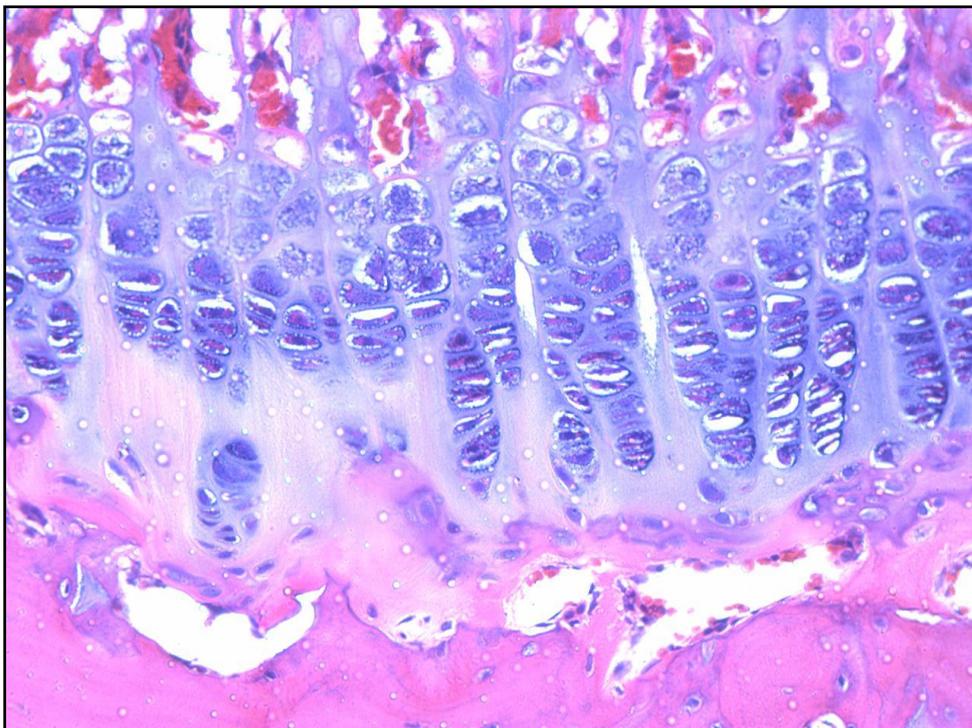
Figura 9 - Área de disco epifisário de cada animal em seus grupos.



Fonte: Dados da pesquisa.

Os animais do grupo 01, os quais receberam alendronato de sódio, mantêm média entre 118821pixel² e 160774pixel² (Figura 10). Os animais do grupo 02, os quais receberam ácido zoledrônico, apresentam médias entre 106943pixel² e 139697pixel² (Figura 11). E, os animais do grupo 03, controle, mostram média entre 199165pixel² e 267069pixel² (Figura 12).

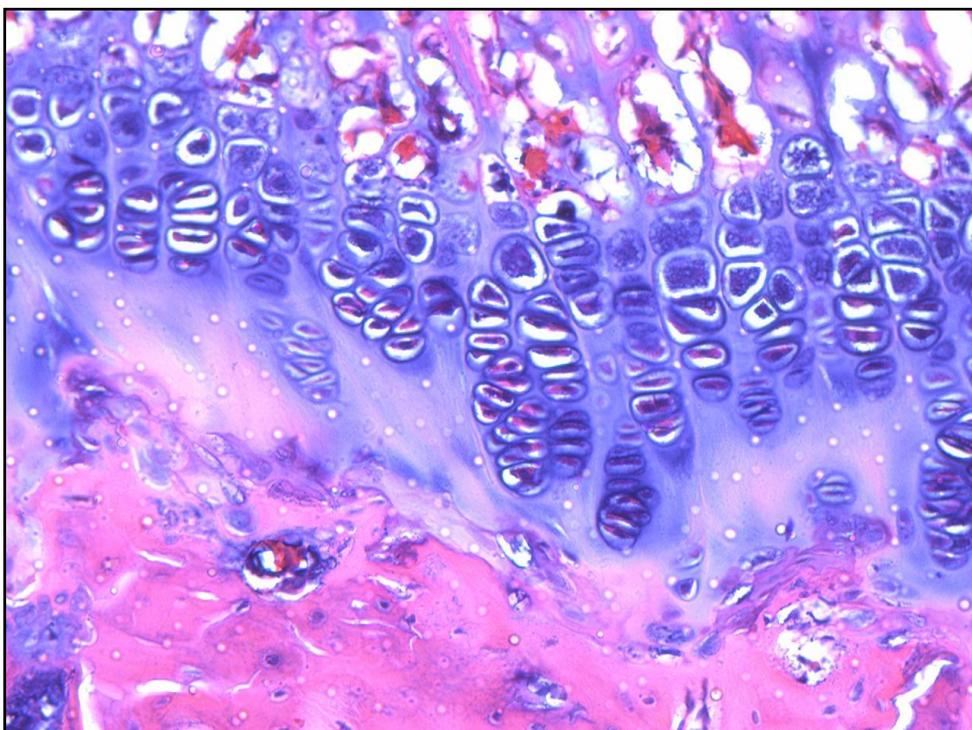
Figura 10 – Fotomicrografia representativa do Grupo 01 – Alendronato de sódio.



Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: Área do disco epifisário, coloração HE, aumento de 400x.

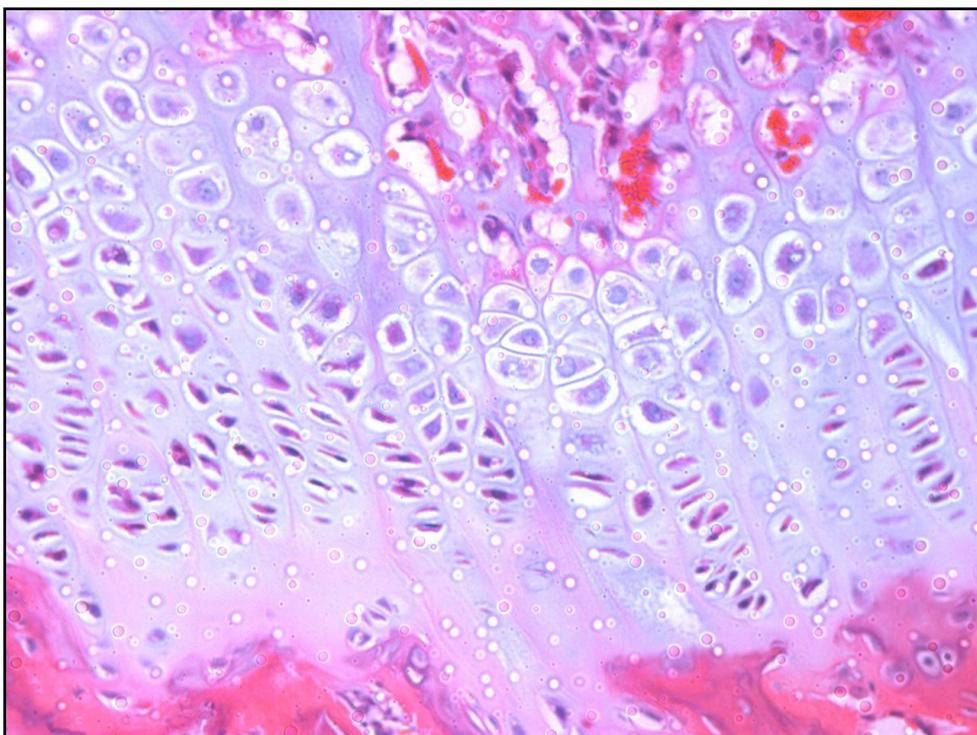
Figura 11 - Fotomicrografia representativa do Grupo 02 – Ácido Zoledrônico



Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: Área do disco epifisário, coloração HE, aumento de 400x.

Figura 12 - Fotomicrografia representativa do Grupo 03 – Controle

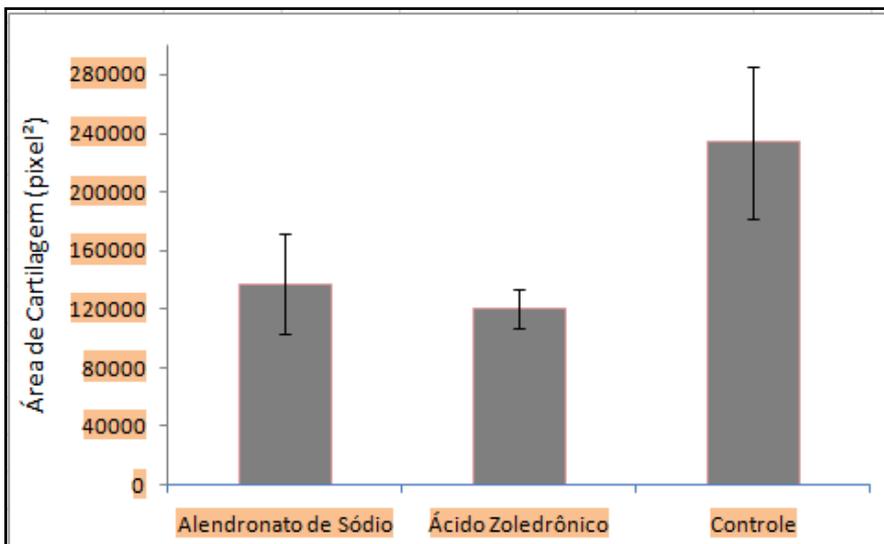


Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: Área do disco epifisário, coloração HE, aumento de 400x.

A figura seguinte ilustra a média dos animais dentro de seu grupo e o desvio padrão correspondente. A média do grupo 01 é de 136945pixel² e desvio padrão é de 34221pixel². No grupo 02, foi encontrada média de 120529pixel² e desvio padrão de13591pixel². E, no grupo 03 a média foi de233905pixel² e desvio padrão correspondente a 51959pixel².

Figura 13 - Média da área de disco epifisário dos animais em cada grupo.



Fonte: Dados da pesquisa.

Para avaliação das médias mensuradas foi utilizado o programa estatístico SPSS for Windows versão 19.0. As médias dos animais foram comparadas nos diferentes grupos, as quais apresentam diferença significativa.

Tabela 1: Comparação Post-Hoc de Bonferroni. Nível de significância de 0,05.

| (I) Grupo | (J) Grupo | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Bonferroni Sig. |
|------------------|------------------|------------------------------|-------------------|------------------------|
| 01 | 02 | 16415,85 | 5834,486 | ,015 |
| | 03 | -96960,57 | 12507,835 | ,000 |
| 02 | 01 | -16415,85 | 5834,486 | ,015 |
| | 03 | -113376,42 | 11606,869 | ,000 |
| 03 | 01 | 96960,57 | 12507,835 | ,000 |
| | 02 | 113376,42 | 11606,869 | ,000 |

Fonte: Dados da pesquisa.

Notas: Comparação da área do disco epifisário do fêmur, porção distal, de ratos.

Grupo 01: alendronato de sódio.

Grupo 02: ácido zoledrônico.

Grupo 03: controle.

5 DISCUSSÃO

Após a análise de diversos estudos envolvendo terapia medicamentosa com bisfosfonatos, encontramos no rato o modelo animal adequado, sendo de custo acessível, pequeno porte e fácil manipulação (BAUSS; PFISTER; PAPAPOULOS, 2008; IWATA et al., 2006; SONIS et al., 2009; FERRETTI et al., 1995; XIONG et al., 2010). Existem estudos que avaliaram o uso dessa classe de medicamentos nesse modelo animal, porém associada a procedimento cirúrgico (MAAHS et al., 2011; KOBAYASHI et al., 2010; AGUIRRE et al., 2010), associada à administração de dexametazona, a fim de simular resposta imunológica do animal (SONIS et al., 2009), e também aqueles que simularam menopausa através de ovariectomia (AGUIRRE et al., 2010). Em contrapartida, não são encontrados estudos que buscam esclarecimentos para o uso dos bisfosfonatos e suas conseqüências diretas nos tecidos ósseos e cartilagosos sem a influência de vieses.

A correlação de idade entre ratos e humanos é muito difícil de definir. No critério músculo-esquelético, do qual foi lançado mão, vimos que o rato apresenta maturação óssea em torno dos 210 dias. Porém, diferente dos humanos, esse modelo animal não apresenta fechamento das epífises nos ossos longos, estando elas presente pela vida toda do animal. Portanto, pode ser feita a mensuração do disco epifisário do animal aos 120 dias (QUINN, 2005).

O uso dessa classe de medicamentos está crescendo progressivamente em humanos. Tais fármacos são administrados em diferentes estágios de doença, como por exemplo, em caso de osteoporose que pode ser tratada com alendronato de sódio enquanto o ácido zoledrônico pode ser empregado nos casos de metástases ósseas (RUGGIERO, 2009). Pensando nisso, esse trabalho buscou avaliar as alterações produzidas unicamente pelo uso do fármaco no tecido cartilaginoso, em região de disco de crescimento.

Foram usados dois fármacos com vias de administração diferentes. A dose de alendronato de sódio para humanos é de 1mg/kg/semana, via oral. Em ratos essa dose deve ser aumentada, pois a biodisponibilidade oral em humanos é muito reduzida (aproximadamente 1%), além disso, a taxa de eliminação do medicamento é maior nos ratos (HUANG et al., 2005). Portanto, as doses foram calculadas e ajustadas. Com base na literatura, a dose do nosso estudo para alendronato de sódio, via gavagem oral, foi de 3mg/kg/dia assemelhando-se àquela administrada por humanos.

O segundo fármaco utilizado foi o ácido zoledrônico, aprovado em 2001 pela FDA. Esse medicamento vem adquirindo sucesso pela eficácia e por necessitar um tempo de infusão

mais curto. É usado para tratamento de metástases ósseas, com dosagens de 4mg/kg/mês durante, pelo menos, 15 minutos (KHOSLA et al., 2007). Para o estudo foi utilizado dosagem de 0,2mg/kg/semana.

O presente trabalho analisou o efeito do uso de dois bisfosfonatos com diferentes formas de administração e diferentes indicações de uso a fim de observar as possíveis alterações microscópicas desenvolvidas em região de disco epifisário do fêmur porção distal de ratos. O resultado do trabalho apresentou alteração na estrutura do disco epifisário, por meio da análise da área correspondente. A comparação das médias de área dos grupos mostrou diferença significativa, ou seja, as terapias com bisfosfonatos utilizadas mostraram que os animais, dentro de seus grupos, mantiveram semelhante comportamento em relação à estrutura de disco epifisário. Da mesma forma, o grupo que não recebeu qualquer medicamento teve comportamento desigual e apresentou área de disco epifisário muito maior.

A diferença estatística encontrada foi evidente quando comparado os animais do grupo controle (não receberam medicação) com os animais do grupo teste (receberam algum medicamento) mostrando haver alteração a nível molecular na área estudada. Sugere-se que a medicação se incorpore a matriz cartilaginosa interferindo no processo de aposição de cartilagem e substituição pelo tecido ósseo. Uma vez que foi possível observar uniformidade, fator limitador do tecido ósseo, nos grupos que receberam a terapia medicamentosa. Porém, não há na literatura qualquer estudo semelhante analisando o efeito de tais fármacos no disco epifisário do fêmur de ratos, para fins de comparação.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo evidenciou alterações ao comparar a área de disco epifisário de diferentes animais tratados com bisfosfonatos, bem como aqueles que não receberam medicação. Essa alteração equivale ao tamanho de área apresentada, sendo que a maior área corresponde ao grupo controle e a menor ao grupo que recebeu terapia medicamentosa com ácido zoledrônico.

Os resultados podem sugerir que os bisfosfonatos interferem no processo de ossificação endocondral resultando em alterações no desenvolvimento ósseo.

REFERÊNCIAS

AGUIRRE, J.I. et al. Effects of alendronate on bone healing after tooth extraction in rats. **Oral Dis.**, Houndmills, v. 16, no. 7, p. 674-685, Oct. 2010.

BAGAN, J.V. et al. Avascular jaw osteonecrosis in association with cancer chemotherapy: series of 10 cases. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 34, no. 2, p. 120-123, Feb. 2005.

BAUSS, F.; PFISTER, T.; PAPAPOULOS, S. Ibandronate uptake in the jaw is similar to long bones and vertebrae in the rat. **J. Bone Miner. Metab.**, Tokyo, v. 26, no. 4, p. 406-408, 2008.

CAPELARI, M.M. **Osteonecrose dos maxilares associada à bisfosfonatos** - Revista da literatura e relato de caso clínico. 2010. 36f. Monografia (Especialista em Cirurgia e Traumatologia BMF) - Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas – Regional de Bauru, Bauru.

INTRODUÇÃO à Osteologia. 2010. Disponível em <http://fisio-sempre.blogspot.com.br/2010_08_01_archive.html> Acesso em: 12 jun. 2013.

FELGUEIRAS, J.C. **Bisfosfonatos e osteonecrose dos maxilares**. 2008. 62f. Monografia (Licenciatura em Medicina Dentária) - Universidade Fernando Pessoa, Porto.

FERRETTI, J.L. et al. Effects of Large Doses of Olpadronate (Dimethyl-Pamidronate) on Mineral Density, Cross-Sectional Architecture, and Mechanical Properties of Rat Femurs. **Bone**, Elmsford, v. 16, no. 4, p. 285S-293S, Apr. 1995.

GARDNER, E.; GRAY, D.J.; O'RAHILLY, R. **Anatomia. Estudo regional do corpo humano**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1964.

GASSER, J.A. et al. The blunting of the bone anabolic response to PTH observed after frequently dosed bisphosphonates in rats may be explained by inhibition of farnesyl diphosphate synthase in osteoblasts. **J. Bone Miner. Res.**, v. 20, no. 78, 2005.

HAM, A.W. **Histologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1967. p. 351-420.

HUANG, R.C. et al. Alendronate inhibits spine fusion in a rat model. **Spine**, Hagerstown, v. 30, no. 22, p. 2516-2522, Nov. 2005.

IWATA, K. et al. Bisphosphonates suppress periosteal osteoblast activity independently of resorption in rat femur and tibia. **Bone**, Elmsford, v. 39, no. 5, p. 1053-1058, Nov. 2006.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto-atlas**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KOBAYASHI, H. et al. Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to

hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice. **J. Bone Miner. Metab.**, Tokyo, v. 28, no. 2, p. 165–175, Mar. 2010.

KHOSLA, S. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the american society for bone and mineral research. **J. Bone Miner. Res.**, New York, v. 22, no. 10, p. 1479-1491, Oct. 2007.

LIN, J.H. et al. Physiological disposition of alendronate, a potent anti-osteolytic bisphosphonate, in laboratory animals. **Drug Metab. Dispos.**, Bethesda, v. 19, no. 5, p. 926-932, Sept/Oct. 1991.

MAAHS, M.A.P. et al. Bisphosphonates and jaw osteonecrosis. **Rev. odonto ciênc.**, v. 24, no. 4, p. 337-344, 2009.

MAAHS, M.P. et al. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in wistar rats. **Head Neck**, New York, v. 33, no. 2, p. 199–207, Feb. 2011.

MARX, R.E. et al. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention and treatment. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 63, no. 11, p. 1567-75, Nov. 2005.

QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? **Nutrition**, Burbank, v. 21, no. 6, p. 775-7, June 2005.

RADHE, N. M. **Efeitos dos bisfosfonatos nitrogenados sobre o osso alveolar**. 2010.108 f. Tese (Doutorado em Estomatologia Clínica) – Faculdade de Odontologia, PUCRS, Porto Alegre.

ROSS, M.H.; REITH, E.J.; ROMRELL, L.J. **Histologia texto e atlas**. 2 ed. São Paulo: Panamericana, 1993. p. 123-180.

RUGGIERO, S.L. et al. American association of oral and maxillofacial surgeon position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws--2009 update. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 67, no. 5, p. 2-12, May 2009.

SONIS, S.T. et al. Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 45, no. 2, p. 164-72, Feb. 2009.

XIONG, H. et al. Effect of alendronate on alveolar bone resorption and angiogenesis in rats with experimental periapical lesions. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 43, no. 6, p. 485-491, June 2010.

ANEXO A – TABELA MICROSOFT EXCEL ILUSTRANDO DISPOSIÇÃO DOS ANIMAIS EM TRÊS GRUPOS E SUAS MÉDIAS

| Grupo | Rato | Código | Média Final (pixel ²) |
|-------|------|----------|-----------------------------------|
| 1 | 1 | aa21 (1) | 160774,6667 |
| 1 | 2 | aa21 (2) | 126120,6667 |
| 1 | 3 | aa21 (3) | 123445,3333 |
| 1 | 4 | aa21 (4) | 137222,8333 |
| 1 | 5 | aa21 (5) | 118821,1667 |
| 1 | 6 | aa21 (6) | 145048,8333 |
| 1 | 7 | aa21 (7) | 147183,5 |
| | | | |
| 2 | 1 | za21 (1) | 117664,8333 |
| 2 | 2 | za21 (2) | 122455,8333 |
| 2 | 3 | za21 (3) | 121079 |
| 2 | 4 | za21 (4) | 139697,3 |
| 2 | 5 | za21 (5) | 116839 |
| 2 | 6 | za21 (6) | 106943 |
| 2 | 7 | za21 (7) | 119415,7 |
| | | | |
| 3 | 1 | c21 (1) | 267069,5 |
| 3 | 2 | c21 (2) | 226947,3333 |
| 3 | 3 | c21 (3) | 238177 |
| 3 | 4 | c21 (4) | 211965 |
| 3 | 5 | c21 (5) | 199165,3 |

ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE, BRASIL



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 09-366

Pesquisadores:

EDELA PURICELLI
ADRIANA CORSETTI
NICOLE DE MILLO RAHDE
DEISE PONZONI

Título: CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO TECIDO ÓSSEO DE RATOS TRATADOS
COM DIFERENTES DOSAGENS DE BISFOSFONATOS NITROGENADOS: ESTUDO
PILOTO

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada ao CEP/HCPA. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

Porto Alegre, 09 de outubro de 2009.


Prof. Nadine Clausel
Coordenadora do CPPC e CEP-HCPA