

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**MATEUS MÜLLER DA SILVA**

**TERAPIA POR BISFOSFONATOS NITROGENADOS: AVALIAÇÃO EM RATOS  
DA ESTRUTURA PERIODONTAL**

Porto Alegre  
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

MATEUS MÜLLER DA SILVA

TERAPIA POR BISFOSFONATOS NITROGENADOS: AVALIAÇÃO EM RATOS DA  
ESTRUTURA PERIODONTAL

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.

**Orientadora:** Profa. Dra. Deise Ponzoni

Porto Alegre  
2020

MATEUS MÜLLER DA SILVA

TERAPIA POR BISFOSFONATOS NITROGENADOS: AVALIAÇÃO EM RATOS  
DA ESTRUTURA PERIODONTAL

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.

**Orientadora:** Profa. Dra. Deise Ponzoni

Porto Alegre, 10 de novembro de 2020.

---

**Profa. Dra. Deise Ponzoni**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

**Profa. Dra. Edela Puricelli**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

**Prof. Dr. Alexandre Silva de Quevedo**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

*“Ao longo da estrada da vida muitas batalhas eu perdi, algumas eu ganhei, mas todas foram necessárias para tornar-me o homem que sou e chegar até aqui...”*

*(Mateus Müller)*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **DEUS**, por me permitir fôlego de vida, saúde, uma família e amigos que me permitiram chegar até aqui.

Aos meus pais, **LAÉRCIO** e **MARLEI** (ambos *in memoriam*) por serem constantes na minha vida e nos meus dias, sempre em minha memória, nos momentos que vivemos juntos e pelos ensinamentos que me deixaram. Esse trabalho, essa dedicação, foco e determinação são por vocês. Amo vocês eternamente!

A minha orientadora Profa. Dra. **DEISE PONZONI** por ser o meu maior exemplo de dedicação ao ensino, ética profissional, competência, seriedade, exemplo de cirurgiã e orientadora. Meu muito obrigado, pelas oportunidades a mim conferidas, bolsas, ensinamentos em pesquisa e uma grande amizade ao longo desses anos como seu Bolsista de IC.

Aos meus Primos: **ANDERSON, MAIARA, CRISTIANE, GABRIEL, MURILO E ARTHUR** por estarem sempre presentes em minha vida, por passarmos juntos nos apoiando mutuamente em momentos difíceis, serem meus exemplos e me apoiarem em todos os sentidos, tornaram-se irmãos. Obrigado por todo incentivo dado aos meus estudos até aqui, por serem compreensivos nos meus momentos de falta em busca desta conquista. Essa conquista, esse trabalho também são dedicados a vocês. Amo vocês!

Aos meus Tios, que sempre me apoiaram ao longo do meu desenvolvimento e crescimento como pessoa e profissional, em especial minha tia **MARINA MÜLLER** (*in memoriam*) por ser um exemplo de mulher, batalhadora e guerreira, bondosa, minha segunda mãe - te amarei eternamente. E ao meu tio **SÉRGIO FREITAS** por sempre me apoiar em todos os sentidos em busca dessa conquista.

Aos **MEUS IRMÃOS** que sempre estiveram presentes ao longo dessa jornada, e que não foi fácil para nós, obrigado por tudo e por entenderem meus momentos de falta em reuniões de família para buscar meus sonhos e objetivos.

Ao meu irmão **DIONATAS** (*in memoriam*) que de uma forma repentina nos deixou esse ano. Obrigado mano por sempre estar ao meu lado me incentivando a continuar. As minhas sobrinhas que amo tanto **MILLENY, EDUARDA, MANUELLA e MELISSA**.

A minha madrasta **MARIA SALETE** (*in memoriam*), por me ensinar muitas coisas sobre a vida, e por ser uma parceira enquanto estive ao meu lado.

Aos **MEUS PRIMOS**, que mesmo longe de mim sempre torceram por mim, me incentivaram, me motivaram a não desistir desse sonho e tornaram-se grandes exemplos de perseverança.

Aos meus amigos e colegas, **ARTUR, EDUARDO, MARGUIT, MATEUS e THIAGO**, por serem grandes amigos que a vida e a faculdade me proporcionaram ao longo desses anos, obrigado pela parceria, incentivos e aprendizados com vocês todos os dias.

As minhas colegas **LARISSA e ROBERTA E FERNANDA** por serem grandes amigas, incentivadoras, e grandes colegas que a faculdade me proporcionou. Passamos tantos momentos e situações juntos que fortaleceram ainda mais nossa amizade, a vocês meu muito obrigado por cada momento vivido nesta faculdade e fora dela.

Aos meus amigos **ARLAN, CARLOS, GILSON, RODRIGO e TALLE**S por serem amigos de pouco tempo, mas que foram importantes ao longo desse último ano, que o Pampahand me proporcionou e nos aproximou.

Ao meu amigo **GABRIEL CABRAL**, por ser um grande amigo, ter se tornando um grande incentivador dessa conquista e por ter dividido grandes momentos de descontração junto comigo.

Ao grupo de handebol **PAMPAHAND** por ter proporcionado grandes amizades ao longo deste último ano, pelas vivências, experiências, aprendizados e campeonatos perdidos e ganhos.

Ao meu amigo **MARCOS PARÉ** e sua família, muito obrigado por todos os momentos de parceria, vivências e experiências, por ser sempre um apoiador e incentivador dos meus sonhos e objetivos, amigo que levo para vida toda.

A **REJANE e SUA FAMÍLIA** por serem grandes incentivadores dessa conquista e me apoiarem sempre na busca desse diploma, mostrando que posso ir cada vez mais longe.

A **SIRLEI e SUA FAMÍLIA**, por serem sempre amigos, incentivadores e grandes motivadores desse sonho, por sempre acreditarem na minha capacidade de conseguir voar mais alto em meus objetivos.

Aos meus Professores ...

Aos Profs. Doutores **ANGELO LUIZ FREDDO e ADRIANA CORSETTI**, por serem sempre amigos, incentivadores da Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo Faciais, por confiarem em mim e no meu trabalho, pelas oportunidades de monitoria que me convidaram para auxiliá-los e por todo conhecimento transmitido.

A Profa. Dra. **MARIA CRISTINA MUNERATO**, pela grande amizade que construímos ao longo de muito trabalho como monitor de Estomatologia, por todo conhecimento transmitido, confiança em mim e no meu trabalho, incentivadora dos meus objetivos dentro da Cirurgia.

Ao Prof. Dr. **ALEXANDRE SILVA DE QUEVEDO**, por ser um grande exemplo de professor e pesquisador, sempre instigando os seus alunos à pesquisa e buscar o conhecimento necessário para a formação de um profissional.

Aos amigos e futuros colegas Cirurgiões-Dentistas **LUÍSA JARDIM, REJANE WERNER, SÉRGIO RODRÍGUEZ, FERNANDO GIFFONI** pela amizade e incentivos para não desistir.

**A FACULDADE DE ODONTOLOGIA E A UFRGS** por permitirem a realização deste sonho, sendo o primeiro membro da minha família a ingressar em uma universidade federal.

Aos Programas de Incentivo à Pesquisa e Iniciação Científica **CNPq, BIC UFRGS** e **FAPERGS** pelas bolsas concedidas e pela viabilidade de realização deste trabalho.

A todos que de certa forma contribuíram para o meu crescimento e a busca pelo sonho de me tornar Cirurgião-Dentista meu **MUITO OBRIGADO!!**

## RESUMO

**Introdução:** A osteonecrose associada ao uso de bisfosfonatos tem se tornado um importante efeito adverso associado ao complexo maxilomandibular. A necessidade de manipular o tecido ósseo e estruturas periodontais em pacientes submetidos à terapia com esta medicação é desafiador uma vez que, os reais eventos que permeiam o desenvolvimento dessa condição permanecem desconhecidas. **Objetivo:** Avaliar quantitativamente os efeitos da administração sistêmica de Ácido Zoledrônico (AZ) sobre o ligamento periodontal (LP) de ratos. **Metodologia:** 21 maxilas de ratos, com peso médio de 250g e 60 dias foram avaliadas, divididas em três grupos: grupo 1 em que animais foram tratados com soro fisiológico, grupo 2 em que os animais submetidos à terapia com AZ por três semanas e grupo 3 em que os animais tiveram a terapia com AZ prolongada por 8 semanas. Ao final de 8 semanas, todos os animais foram mortos e as peças preparadas e coradas com HE para avaliação histomofométrica. A análise foi realizada através de um corte axial adjacente à região de furca do primeiro molar superior direito. A área de ligamento periodontal da raiz méso-palatina foi avaliada com o auxílio do *software* Image J. **Resultados:** Não foram encontradas diferenças significativas ( $p > 0.05$ ) entre os grupos em relação a área do LP. **Conclusões:** Considerando as condições empregadas neste estudo e o grupo amostral o fármaco não foi capaz de alterar a área do LP.

**Palavras-chave:** Osteonecrose associada a bisfosfonatos, Bisfosfonatos, Ácido Zoledrônico, Ligamento periodontal.

## ABSTRACT

**Introduction:** Bone-dental osteonecrosis associated with bisphosphonates has become an important adverse effect associated with the maxillomandibular complex. The need to manipulate bone tissue and gingival support structures in patients undergoing therapy with this medication is of concern, since the actual events that permeate the development of this condition remain undetermined. **Objective:** to quantitatively evaluate the effects of systemic administration of Zoledronic Acid (AZ) on the periodontal ligament (LP) of rats. **Methodology:** 21 rat jaws with an average weight of 250g and 60 days were used, divided into three groups: group 1 gave rise to animals that were treated with saline, group 2 to animals that underwent AZ therapy for three weeks. and group 3 to animals that prolonged the use of the drug for eight weeks. At the end of eight weeks, all animals were killed and the pieces prepared and stained with HE for histomorphometric evaluation. The analysis was carried out through an axial cut adjacent to the furcation region of the first right upper molar. The mesiopalatal root was used for analysis. To evaluate the area of periodontal ligament, the software Image J. was used. **Results:** There were no significant differences ( $p > 0.05$ ) between the groups in relation to the area of the LP. **Conclusions:** Considering the conditions used in this study and the sample group, the drug was not able to change the LP area.

**Keywords:** Osteonecrosis associated with bisphosphonates, Bisphosphonates, Zoledronic acid, Periodontal ligament.

## SUMÁRIO

<b>1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA</b> .....	11
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 OBJETIVO GERAL	
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	
<b>3 ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	16
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	28
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	29
<b>APÊNDICE</b> .....	33
<b>ANEXO</b> .....	34

## 1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

Os bisfosfonatos são amplamente usados no manejo de pacientes com doenças relacionadas a alterações no metabolismo ósseo. Pertencem à maior classe de drogas anti reabsortivas, atuando em enfermidades como osteoporose, doença de Paget, neoplasias como mieloma múltiplo e hipercalemia maligna, metástases ósseas associadas ao câncer de mama, próstata, pulmão e a outros tumores de tecidos moles (MIGLIORATI, 2003; MARX, 2005; RUSSELL; WATTS; EBETINO; ROGERS, 2008; RUGGIERO, 2009; KOS; BRUSCO; KUEBLER; ENGELKE, 2010).

Essa classe de medicamentos possui alta afinidade com os tecidos ósseos. Sua característica de ação está relacionada ao seu mecanismo seletivo sobre a atividade osteoclástica, por ser análogo sintético do pirofosfato, um inibidor natural da reabsorção óssea, o que lhe proporciona alta afinidade aos cristais de fosfato de cálcio (hidroxiapatita) (ROELOFS; THOMPSON; GORDON; ROGERS, 2006). Os bisfosfonatos podem ser divididos em dois grupos conforme a presença ou ausência de nitrogênio em sua composição. A presença do átomo de nitrogênio confere ao medicamento maior poder de inibição reabsortiva. Dentre a classe de bisfosfonatos nitrogenados pertencem o Alendronato, o Ácido Zoledrônico, o Risendronato, o Pamidronato e o Ibandronato (ROELOFS; THOMPSON; GORDON; ROGERS, 2006). Durante a reabsorção, no ambiente ácido da lacuna de Howship, os bisfosfonatos englobados no osso são liberados, atingem altas concentrações em solução ou na forma de sais de cálcio e são internalizados pelos osteoclastos e macrófagos por endocitose, afetando-os diretamente, promovendo a perda de função ou apoptose da célula, por inibição de sistemas enzimáticos ou produção de metabólitos citotóxicos. Em consequência da menor atividade osteoclástica, o metabolismo ósseo é alterado em sua relação osteoclasto e osteoblasto, o que favorece a neoformação óssea com aumento da área de osso trabecular (ROELOFS; THOMPSON; GORDON; ROGERS, 2006; RUSSELL; WATTS; EBETINO; ROGERS, 2008).

Os bisfosfonatos nitrogenados agem intracelularmente bloqueando a síntese da enzima farnesil difosfato (FPPs), importante na via mevalonato. A interrupção dessa via impede a formação de dois metabólitos, o farnesol e geranylgeraniol, que são essenciais para o funcionamento adequado da célula. Esta enzima é inibida por concentrações nanomoleculares de bisfosfonatos nitrogenados, neste quesito o Ácido Zoledrônico é extremamente potente mesmo em concentração picomolares. Os bisfosfonatos que não possuem um átomo de nitrogênio em sua estrutura química não inibem proteínas, possuem um mecanismo diferente de ação o qual parece envolver principalmente a formação de metabólitos citotóxicos em

osteoclastos. Além disso, estes fármacos reduzem a viabilidade dos macrófagos, induzindo mudanças significativas na morfologia celular e prejudicando a diferenciação de monócitos para macrófagos. Ao que parece, os bisfosfonatos nitrogenados, guardam alguma capacidade antitumoral, contudo este efeito ainda não está bem esclarecido (RODAN, 1998; COXON; OADES; KIRBY; COLSTON, 2004; ROELOFS; THOMPSON; GORDON; ROGERS, 2006; PATNTIRAPONG; POOLGESORN N, 2018).

O Ácido Zoledrônico [1-Hydroxy-2-(1H-imidazole-1-yl) ethylidene] é tido como um dos mais potentes bisfosfonatos nitrogenados. Sua eficácia na adesão da matriz mineralizada e na apoptose de células tumorais mesmo em doses baixas já tem sido comprovado (COXON 2004). Em modelo animal rato, o Ácido Zoledrônico provou ser efetivo em prevenir doenças ósseas com apenas uma única dose, em animais que haviam sido injetados por células tumorais (CROUCHER et al, 2003; MIGLIORATI, 2003). Metcalf, Pandha e Morgan (2011) observaram em seu trabalho o efeito do bisfosfonatos sobre a angiogênese. Os resultados mostraram a característica dose dependente dessas drogas sobre as células endotéliais, quanto maior a dose, menor capacidade de formação de novos vasos.

Devido ao amplo emprego dessa droga, o esquema de administração pode ser bastante variável. Comumente reserva-se o uso de bisfosfonatos via oral para casos de osteoporose e osteopenia. Porém, trabalhos com a administração de doses anuais de Ácido Zoledrônico (5mg) ao longo de três anos, em pacientes que apresentam osteoporose pós-menopausa, mostra significativa redução no risco de fraturas de ossos longos. Com isso a indicação para o uso dessa medicação vem se tornando mais frequente (BLACK et al, 2007).

Estudos *in vitro* demonstram que bisfosfonatos nitrogenados possuem efeito sobre praticamente todas as células, atingindo inclusive culturas de células osteoclásticas, osteoblásticas, macrófagos, células epiteliais, endoteliais. Sendo os osteoclastos e os macrófagos os mais sensíveis a baixas concentrações (1-10  $\mu\text{mol/L}$ ) *in vitro* (ROELOFS; THOMPSON; GORDON; ROGERS, 2006).

A ocorrência de necrose óssea associada ao uso de bisfosfonatos é considerada de exclusividade do complexo maxilomandibular. Vem sendo descrita desde 2003, como um importante efeito adverso. Inicialmente relacionada ao uso de drogas com alta dosagem e administração intravenosa como Pamidronato e Ácido Zoledrônico. Contudo, vem tornando se frequente a associação também a drogas de administração por via oral como é o caso do Alendronato Sódico (MARX, 2003; 2005; MINJU SUNG, 2019).

A condição para ser definida como osteonecrose da arcada ósseo-dentária associada à bisfosfonatos, segundo Ruggiero (2009) deve ser associada a tratamento atual ou prévio com bisfosfonatos, exposição do tecido ósseo do complexo maxilomandibular ao meio bucal

persistente e ausência de história de radioterapia na região de cabeça e pescoço.

Dentre as alterações clínicas mais comumente encontradas estão à exposição óssea, dor, sequestro ósseo, fístulas em tecido mucoso podendo estender-se até superfície cutânea, edema, parestesia e suscetibilidade a fraturas patológicas (MARX, 2005; KOS; BRUSCO; KUEBLER; ENGELKE, 2010; ALMĂŞAN et al, 2011). Frequentemente está relacionada a procedimentos invasivos prévios tais como exodontias, remoção de cistos, implantes dentários e trauma dento-alveolar (RUGGIERO et al, 2004; MARX, 2005; KOS; BRUSCO; KUEBLER; ENGELKE, 2010). Contudo não é incomum a ocorrência de lesões mesmo na ausência de intervenções prévias, casos de trauma devido ao uso de prótese removíveis e condições anatômicas também parecem ter associação (MARX, 2005). O sítio de maior incidência parece ser a mandíbula (RUGGIERO et al, 2004; MARX, 2005; KOS; BRUSCO; KUEBLER; ENGELKE, 2010).

Em um estudo com 63 casos de pacientes com osteonecrose de mandíbula e maxila que haviam feito uso de bisfosfonatos intravenoso e via oral, 38% apresentaram lesões envolvendo a maxila e 68% apresentaram envolvimento com o osso mandibular, 14% não apresentavam história prévia de atendimento invasivo odontológico. Nos achados clínicos foram observadas a presença de exposição óssea e necrose dos tecidos ósseos alveolares em todos os indivíduos da amostra. Os autores sugeriram cautela aos clínicos devido ao potencial de desenvolvimento de necrose óssea alveolar pelo uso de bisfosfonatos (RUGGIERO et al, 2004).

Pesquisas têm sido realizadas a fim de reproduzir, em modelo animal, características semelhantes à osteonecrose dos maxilares observada em pacientes que fazem uso de bisfosfonatos, como método para estudo da patogênese dessa condição. Bi e colaboradores (2010) confirmaram em seu estudo realizado com uma amostra composta por ratos, que longos períodos de uso de bisfosfonatos em altas doses são capazes de desenvolver defeito ósseo e impossibilidade de reparo após exodontia.

Na revisão do assunto realizada por Russell e colaboradores (2008), destaca-se que há uma mudança do padrão ósseo devido à inibição do processo reabsortivo, o que tem efeito direto sobre a densidade óssea mesmo diante da ausência de uma doença metabólica prévia. Kobayashi e colaboradores (2010) avaliaram os efeitos no reparo alveolar de ratos submetidos à terapia com um bisfosfonato nitrogenado (Ácido Zoledrônico), após extração dentária. A análise histomorfométrica mostrou que a migração de células endoteliais para região do alvéolo foi significativamente menor no grupo que recebeu bisfosfonato comparado ao grupo controle, sugerindo que possa existir inibição da angiogênese, fato crítico para o reparo alveolar. Oyhanart e colaboradores (2015) apresentaram em seus resultados o aumento da espessura óssea interradicular e em outros sítios de animais que sofreram terapia com

bisfosfonatos em fase de crescimento.

A estrutura periodontal pode desenvolver um papel crítico na patogênese desta condição. Alterações radiográficas tais como espessamento da lâmina dura e obscurecimento do espaço do ligamento periodontal, decorrentes do uso de bisfosfonatos têm sido relatadas (RUGGIERO et al., 2009). Okamoto e colaboradores (2013) realizaram um trabalho em ratos, analisando o ligamento periodontal com diferentes dosagens de ácido zoledrônico. Através de análises histológicas foi observada diminuição na espessura do espaço periodontal gradativamente ao aumento da dosagem utilizada. Contudo o trabalho não obteve sucesso em diagnosticar tais diferenças após teste estatístico, os autores sugerem a realização de novos estudos com “*n*” amostral superior.

Além disso, as investigações realizadas no estudo de Koth e colaboradores (2016) de forma radiográfica mostraram associação entre as condições de osteonecrose dos maxilares e uso de bisfosfonatos. Porém, o espaço do ligamento periodontal e o aumento da lâmina dura não tiveram associação com a condição estudada. Os autores recomendam novas investigações através de estudos experimentais avaliando outras estruturas do ligamento periodontal para elucidar a patogênese da osteonecroses dos maxilares.

Estudos mais atuais relacionados ao entendimento da patogênese desta condição avaliaram diretamente dentes extraídos de pacientes que foram tratados por via intravenosa com bisfosfonatos, tendo por objetivo detectar alterações no cemento e seus componentes celulares. Entretanto, observou-se que não foram encontradas diferenças significativas no aumento da espessura do cemento, no número de células e nos testes para imunohistoquímica das células provenientes do cemento radicular (PAULI PAGLIONI et al., 2017).

Mengyu li e colaboradores (2019) avaliaram em um estudo as células-tronco provenientes do ligamento periodontal e encontraram resultados como a diminuição da capacidade proliferativa, adesão destas células e migração quando comparados ao grupo controle. Os autores justificam este fato pela impossibilidade de reparo ósseo nas estruturas periodontais em animais tratados com bisfosfonatos.

Através dos achados citados acima, nota-se a necessidade do entendimento do real efeito dos bisfosfonatos sobre as estruturas de suporte dentário, uma vez que os reais eventos que permeiam a osteonecrose da arcada óssea dentária associada aos bisfosfonatos ainda não foram totalmente esclarecidos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O presente estudo propõe-se a avaliar a estrutura periodontal de ratos submetidos à terapia com ácido zoledrônico.

### **2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO**

- Comparar quantitativamente a área do ligamento periodontal em animais sem e com terapia por ácido zoledrônico em diferentes tempos de administração do fármaco.

### **3 ARTIGO**

O artigo resultante do Trabalho de Conclusão de Curso será formatado de acordo com as normas da Revista ***REVISTA DE CIÊNCIAS MÉDICAS E BIOLÓGICAS (DA BAHIA)***.

**Terapia por bisfosfonato nitrogenado: avaliação em ratos da estrutura periodontal**  
**Nitrogen bisphosphonate therapy: evaluation in rats of the periodontal structure**

Mateus Müller<sup>1</sup>; Viviane Neves Pacheco<sup>2</sup>; Alexandre de Quevedo<sup>3</sup>; Deise Ponzoni<sup>4</sup>

**Resumo**

**Introdução:** A osteonecrose da arcada ósseo-dentária associada à bisfosfonatos têm se tornado um importante efeito adverso associado ao complexo maxilo-mandibular. A necessidade de manipulação do tecido ósseo e estruturas de suporte gengivais em pacientes que realizam terapia com essa medicação trás preocupação, uma vez que os reais eventos que permeiam o desenvolvimento dessa condição permanecem indeterminados. **Objetivo:** avaliar quantitativamente os efeitos da administração sistêmica de Ácido Zoledrônico (AZ) sobre ligamento periodontal (LP) de ratos. **Metodologia:** utilizou-se 21 maxilas de ratos com peso médio de 250g e 60 dias, divididos em três grupos: grupo 1 deu origem ao controle, grupo 2 composto por animais que receberam AZ por três semanas e o grupo 3 por animais que prolongaram a terapia por oito semanas. Ao término de oito semanas todos os animais foram mortos e as peças preparadas com coloração HE para avaliação histomorfométrica do LP. A análise foi realizada através de um corte axial adjacente à região de furca do primeiro molar superior direito. A área de ligamento periodontal da raiz méso-palatina foi avaliada com o auxílio do *software* Image J. **Resultados:** Não foram encontradas diferenças significativas ( $p>0.05$ ) entre os grupos em relação a área do LP. **Conclusões:** Considerando as condições empregadas neste estudo e o grupo amostral o fármaco não foi capaz de alterar a área do LP.

**Palavras-chave:** Osteonecrose associada a bisfosfonatos, Bisfosfonatos, Ácido Zoledrônico, Ligamento periodontal.

1. Acadêmico do Curso de Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
2. Doutora em Odontologia, Programa de Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
3. Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia e Ortopedia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
4. Professora Titular do Departamento de Cirurgia e Ortopedia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

**Terapia por bisfosfonato nitrogenado: avaliação em ratos da estrutura periodontal**  
**Nitrogen bisphosphonate therapy: evaluation in rats of the periodontal structure**

Mateus Müller <sup>1</sup>; Viviane Neves Pacheco<sup>2</sup>; Alexandre de Quevedo<sup>3</sup>; Deise Ponzoni<sup>4</sup>

**Abstract**

**Introduction:** Osteonecrosis of the bone-dental arch associated with bisphosphonates has become an important adverse effect associated with the maxillomandibular complex. The need for manipulation of bone tissue and gingival support structures in patients undergoing therapy with this medication is of concern, since the actual events that permeate the development of this condition remain undetermined. **Objective:** to quantitatively assess the effects of systemic administration of Zoledronic Acid (AZ) on the periodontal ligament (LP) of rats and describe the morphology of the adjacent bone (OA). **Methodology:** 21 rat jaws with an average weight of 250g and 60 days were used, divided into three groups: group 1 gave rise to the control, group 2 composed of animals that received AZ for three weeks and group 3 by animals that prolonged the therapy by eight weeks. At the end of eight weeks, all animals were killed and the pieces were prepared in HE stain for histomorphometric evaluation of the LP. The analysis was performed through an axial cut right after the furcation region of the first right upper molar, the mesiopalatal root was chosen to evaluate the LP area. **Results:** There were no significant differences ( $p > 0.05$ ) between the groups regarding the area of LP. **Conclusions:** Considering the conditions used in this study and the sample group, the drug was not able to change the area of the LP.

**Keywords:** Osteonecrosis associated with bisphosphonates, Bisphosphonates, Zoledronic acid, Periodontal ligament.

## INTRODUÇÃO

A osteonecrose da arcada óssea dentária associada ao uso de bisfosfonatos tem sido relatada na literatura desde 2003, como um importante efeito adverso. No entanto, esta condição é exclusiva do complexo maxilo-mandibular e possui estreita relação com o uso de fármacos em altas dosagens e administração por via intravenosa, como o Pamidronato e Ácido Zoledrônico. Além disso, estudos mostram que o uso de Alendronato de Sódio por via oral também está associado à osteonecrose dos maxilares (MIGLIORATI; MARX, 2003; 2005; MINJU SUNG, 2019).

A osteonecrose da arcada óssea dentária associada à bisfosfonatos é caracterizada pela exposição persistente de tecido ósseo do complexo maxilo-mandibular ao meio bucal, não existindo histórico anterior de radioterapia na região de cabeça e pescoço (RUGGIERO, 2009). As manifestações clínicas mais comuns frente a esta patologia são: exposição óssea, dor, sequestro ósseo, edema, fístulas em tecido mucoso que podem se estender até a região cutânea e suscetibilidade a fraturas patológicas (MARX, 2005; KOS; BRUSCO; KUEBLER; ENGELKE, 2010; ALMĂŞAN et al, 2011). Também pode estar relacionada a procedimentos invasivos prévios como exodontias, remoção de cistos, trauma dento-alveolar e implantes. Porém, não é incomum o aparecimento desta condição mesmo na ausência de procedimentos prévios, sendo a mandíbula relatada como o sítio de maior incidência (RUGGIERO et al, 2004; MARX, 2005; KOS; BRUSCO; KUEBLER; ENGELKE, 2010).

Os bisfosfonatos são uma classe de medicamentos que possuem alta afinidade pelo tecido ósseo, uma vez que o seu mecanismo de ação está relacionado com atividade osteoclástica por serem análogos sintéticos do pirofosfato, um inibidor natural da reabsorção óssea, o que lhes proporciona alta afinidade aos cristais de fosfato de cálcio (hidroxiapatita) (RODAN, 1998; RUSSELL; WATTS; EBETINO; ROGERS, 2008; RUGGIERO, 2009). Os bisfosfonatos podem ser divididos em dois grupos conforme a presença ou ausência de nitrogênio em sua composição. A presença do átomo de nitrogênio confere ao medicamento maior poder de inibição reabsortiva. Dentro da classe de bisfosfonatos nitrogenados pertencem o Alendronato, Ácido Zoledrônico, Risendronato, Pamidronato, Ibandronato (ROELOFS; THOMPSON; GORDON; ROGERS, 2006). Assim sendo, os fármacos mais prescritos entre os bisfosfonatos estão o Alendronato de sódio e o Ácido Zoledrônico (PATNTIRAPONG; POOLGESORN, 2018).

Atualmente são utilizados em larga escala para o tratamento das doenças relacionadas ao metabolismo ósseo em patologias como osteoporose, doença de Paget, neoplasias, mieloma múltiplo) e hipercalemia maligna, metástases ósseas associadas ao câncer de mama, próstata,

pulmão e a outros tumores de tecidos moles (MARX, 2005; RUSSELL; WATTS; EBETINO; ROGERS, 2008; RUGGIERO, 2009; KOS; BRUSCO; KUEBLER; ENGELKE, 2010).

A estrutura periodontal pode desempenhar um papel importante na patogênese da osteonecrose dos maxilares, uma vez que os reais eventos que permeiam esta condição ainda permanecem indeterminados. Alterações radiográficas, tais como, espessamento da lâmina dura e escurecimento do espaço do ligamento periodontal, decorrentes do uso de bisfosfonatos foram relatados em outros estudos (RUGGIERO et al., 2009). Okamoto e colaboradores (2013) realizaram um trabalho em ratos, analisando o ligamento periodontal com diferentes dosagens de Ácido Zoledrônico. Através de análises histológicas foi observada diminuição na espessura do espaço periodontal gradativamente ao aumento da dosagem utilizada. Contudo, o trabalho não obteve sucesso em diagnosticar tais diferenças após teste estatístico, os autores sugerem a realização de novos estudos com “n” amostral superior. Além disso, alterações como diminuição da capacidade proliferativa, migratória e viabilidade celular das células-tronco do ligamento periodontal foram relatados (MENGYU LI et.al, 2019).

Tendo em vista o uso dessa classe de medicamentos e a incerteza da patogênese da osteonecrose da arcada óssea dentária associada à bisfosfonatos, este trabalho tem como objetivo avaliar a área do ligamento periodontal de ratos submetidos à terapia com Ácido Zoledrônico.

## **MATERIAIS E MÉTODO**

### **Caracterização da amostra e obtenção do material para o estudo**

Foram utilizadas na avaliação maxilas de ratos albinos, heterogênicos da espécie *Rattus Novergicus Albinus*, cepa *Wistar*, machos, clinicamente sadios com idade média de 60 dias e peso médio de 250 gramas.

As 21 maxilas foram divididas em três grupos, com sete amostras por grupo: Grupo 1 (grupo controle, animais que receberam soro fisiológico por oito semanas), Grupo 2 (animais submetidos à terapia com Ácido Zoledrônico por três semanas) e Grupo 3 (animais submetidos à terapia com Ácido Zoledrônico por oito semanas). Os animais submetidos à terapia com Ácido Zoledrônico receberam o bisfosfonato por via intraperitoneal, na dosagem de 0,2mg/Kg. A frequência de administração foi de uma dose semanal, considerando a posologia utilizada para tratamento de neoplasias. Todas as amostras foram obtidas em oito semanas, a partir do início do estudo. As maxilas foram colocadas em recipientes plásticos devidamente identificados, fixadas e conservadas em formalina neutra tamponada a 10%, com

a finalidade de evitar as alterações *post mortem*.

### **Estudo histológico**

O preparo das peças foi realizado no Serviço de Patologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O material foi descalcificado em solução de ácido nítrico a 5% (10ml) durante 07 dias e desidratado, em concentrações sucessivas de álcool (de 80% até 100%). Após descalcificação, a região da maxila associada ao primeiro molar superior direito foi seccionada axialmente na região da furca. O material recebeu processamento histológico de rotina para inclusão em parafina e coloração com hematoxilina e eosina. Os cortes histológicos foram obtidos com a espessura de 4µm. A raiz méso-palatina foi eleita para análise do espaço do ligamento periodontal. Duas lâminas de cada amostra foram realizadas. Todas as lâminas foram codificadas para garantir o cegamento durante o processo de análise.

### **Análise histomorfométrica do espaço do ligamento periodontal**

A análise histomorfométrica foi realizada com um microscópio óptico, com objetiva de 50x, permitindo a visualização de todo diâmetro da raiz méso-palatina e osso adjacente. A área mensurada correspondeu ao espaço do ligamento periodontal, obtida através da razão entre o espaço do alvéolo dentário e o espaço do dente (OKAMOTO et al, 2013). As imagens foram capturadas, através de uma câmera de vídeo (Olympus®, Qcolor 5, Coolet, RTV.) acoplada a um microscópio binocular (Olympus® Optical Co., CX41RF) e a um computador (Dell, Dimension 5150), utilizando o software Qcapture® ( Versão 2.81; Quantitative Imaging Corporatio, Inc.; 2005) (Figuras 1 e 2). A quantificação deu-se através da utilização do software Image J (versão 1.48v), de acordo com as recomendações do fabricante e supervisão de uma professora de Patologia Bucal. Para cada maxila foi considerada a média das duas lâminas.

### **Análise estatística**

Com o objetivo de avaliar a área do ligamento periodontal e sua variabilidade entre os animais submetidos a diferentes tratamentos, foi realizada uma relação entre área da raiz (MI) e a área da cavidade alveolar (ME) (OKAMOTO et al, 2013). Este procedimento foi feito através da fórmula: ME/MI. Os dados foram expressos por média  $\pm$  desvio padrão. A

normalidade da distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov Smirnov. Para comparação entre grupos, as médias foram comparadas utilizando a ANOVA de medidas independentes seguido do post-hoc do teste post hoc LSD de Fisher. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos se  $P < 0,05$ . O programa SPSS 20.0 foi usado para todas as análises estatísticas.

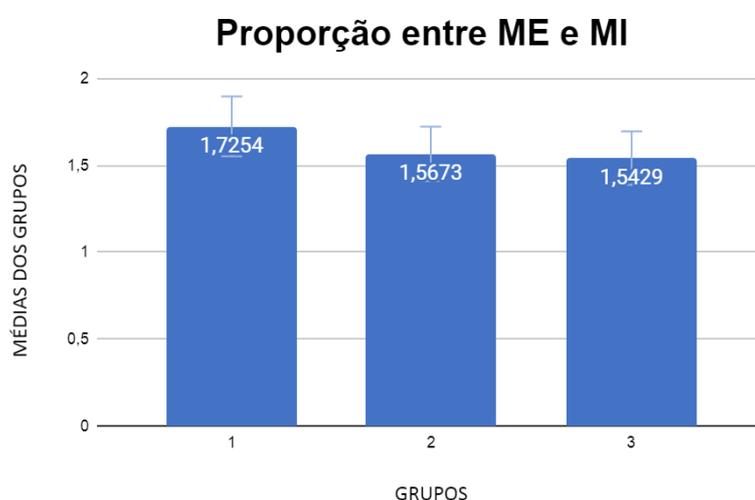
## RESULTADOS

### Análise histomorfométrica

Durante o processamento histológico foram perdidas amostras do grupo que realizou a terapia por oito semanas (Grupo 3), restando cinco maxilas.

O uso do fármaco não gerou alterações na anatomia radicular e dentária, também não foram encontrados sinais de anquilose e reabsorções radiculares na altura dos cortes examinados. Após a análise estatística observou-se que a terapia, de forma isolada, não foi capaz de alterar a área do ligamento periodontal nos diferentes tempos de terapia ( $P > 0,05$ ) (Figura 3). O tempo decorrido de três semanas após uso de bisfosfonato (Grupo 2) e o prolongamento da medicação para oito semanas (Grupo 3) quando comparados ao grupo teste (Grupo 1) não mostrou alterações nesta estrutura em ratos.

Figura 3 - Gráfico relacionando os grupos e as médias derivadas da proporção entre a média externa (ME= alvéolo dentário) e média interna (MI= raiz dentária). Grupo 1 – soro fisiológico, Grupo 2 - AZ por três semanas e Grupo 3 – AZ por oito semanas.



## DISCUSSÃO

A osteonecrose dos maxilares associada aos bisfosfonatos é caracterizada por uma condição distinta e que se diferencia na prática clínica de qualquer outra manifestação bucal. Esta condição, como já descrita por vários autores, deve estar relacionada à terapia prévia com qualquer tipo de bisfosfonato podendo haver ou não procedimentos odontológicos realizados como exodontias, doença periodontal, implantes ou até mesmo remoção cirúrgica de cistos e neoplasias bucais (MARX, 2003, 2005). Nas maxilas utilizadas nesse estudo não foram observadas características da osteonecrose dos maxilares, possivelmente por não terem sido realizados procedimentos cirúrgicos, condição que pode favorecer aparecimento de um sítio de infecção.

A escolha do rato para essa pesquisa, levou em consideração as similaridades que os roedores apresentam em seus processos biológicos/fisiológicos comparados com os humanos. Além disso, no rato, o metabolismo se dá de forma muito mais acelerada. Por serem animais de pequeno porte, são de fácil manuseio para a aplicação de fármacos e apresentam um baixo custo para alojamento e manutenção ao longo da terapia medicamentosa proposta (FAGUNDES, TAHA, 2004)

Ao contrário de estudos que utilizaram os incisivos de ratos (OKAMOTO et al., 2013; MORI et al., 2010), para a avaliação histológica foi considerado o primeiro molar superior do rato. Esse dente apresenta cinco raízes (KOMATSU et al., 2008; CHOI et al., 2010) que após a erupção, mantém características constantes ao longo da vida do roedor. Condição essa, que não pode ser associada aos incisivos que apresentam crescimento constante (CAPELLO, V. 2015).

O presente estudo utilizou um modelo experimental livre de qualquer outro tipo de patologia e/ou uso de outros fármacos com o intuito de desenvolver osteonecrose da arcada óssea dentária relacionada ao uso de bisfosfonatos. Outros trabalhos que utilizaram o rato, como modelo animal, na sua grande maioria empregaram fármacos, imunossupressores ou fizeram o desenvolvimento de desordens metabólicas prévias nos seus experimentos para obterem a osteonecrose dos maxilares (SONIS et al., 2008; BI et al., 2010; SASAKI et al., 2010; HOKUGO et al., 2010; ALI-ERDEM et al., 2011). Nesse experimento foi avaliado, isoladamente, o real efeito do bisfosfonato (Ácido Zoledrônico) sobre a estrutura do ligamento periodontal, considerando que outras medicações poderiam interferir na análise proposta. O Ácido Zoledrônico é um dos bisfosfonatos mais utilizados, de ação potente sobre o metabolismo ósseo e frequentemente associado a efeitos adversos (RODAN, 1998; RUSSELL

et al., 2008; RUGGIERO, 2009).

Diferentes concentrações de Ácido Zoledrônico foram utilizadas em ratos para induzir a osteonecrose dos maxilares (SILVA et al., 2015). O mesmo pode ser considerado nos estudos que buscam avaliar o efeito deste fármaco sobre o periodonto (FRANZONI et al.; CHUI et al. 2017; OKAMOTO et al., 2013). Nesse estudo foi empregada a dose de 0,2mg/kg/semanalmente (SILVA et al., 2015). A definição da dose foi baseada na utilização do fármaco para o tratamento de metástases ósseas em humanos (KHOSLA et al., 2007) e nas diferenças de metabolismo entre humanos e ratos (SILVA et al., 2015). Okamoto e colaboradores (2013) empregaram doses crescentes de Ácido Zoledrônico (10, 50 e 500 µg/kg), a fim de estabelecer uma relação de dose-dependência. Os achados sugerem que quanto maior a concentração, maior o estreitamento do espaço do ligamento periodontal.

A literatura ainda é escassa em avaliações relacionadas às estruturas de suporte dos dentes frente a terapia por bisfosfonatos (YUKINORI et al. 2008; JACOBS et al., 2014; FRANZONI et al., 2017). Sabe-se que inúmeros processos adaptativos do periodonto são observados ao longo da vida, tanto no homem quanto no rato, em resposta à ação de força mastigatórias, forças mecânicas (terapias ortodônticas) e administração de fármacos (JACOBS et al., 2014; FRANZONI et al., 2017).

Estudos *in vitro* mostraram que os bisfosfonatos podem causar citotoxicidade ao epitélio bucal (REID et al, 2007). Correia e colaboradores (2006) demonstram efeitos citotóxicos nos fibroblastos do ligamento periodontal. Também, a hipótese de que concentrações micromolares de ácido zoledrônico são citotóxicas para fibroblastos humanos da gengiva e do ligamento periodontal foi testada por Agis e colaboradores (2010). Esses autores demonstraram a supressão da atividade celular causada pelo Ácido Zoledrônico livre, acompanhada de danos aos fibroblastos periodontais, levando à necrose e apoptose.

Nesse estudo, de forma semelhante aos demais, a análise microscópica não mostrou alterações nos tecidos de suporte. O ligamento periodontal esteve presente em todas as raízes seccionadas e não foi identificada a presença de anquilose ou reabsorções em nenhuma das amostras (KOMATSU et al., 2008; OKAMOTO et al., 2013).

Com relação à área do ligamento periodontal os resultados demonstram que a utilização do fármaco AZ, de forma isolada, não foi suficiente para desenvolver alterações estatisticamente significativas. Também, o tempo de terapia não foi capaz de levar ao estreitamento significativo do LP. Entretanto, pode notar-se uma possível tendência à diminuição dessa estrutura quando comparados os grupos entre si, possivelmente pelo emprego de uma dose constante na terapia proposta ao longo das três e oito semanas o que difere do método utilizado por outros estudos (KOMATSU et al., 2008; OKAMOTO et al.,

2013). Além disso, um número maior de animais por grupos poderia mostrar alguma alteração significativa ao longo deste tratamento.

Considerando a metodologia empregada no estudo e a partir dos resultados encontrados, sugere-se a avaliação microscópica de outras estruturas periodontais, como o osso alveolar adjacente, para complementação de informações acerca da morfologia dessa estrutura de suporte em ratos submetidos à terapia com Ácido Zoledrônico.

## CONCLUSÃO

A terapia com o uso de Ácido Zoledrônico não desenvolveu alterações nos componentes radiculares e não promoveu a diminuição da área do ligamento periodontal, através avaliação por histomorfometria, nos diferentes tempos de tratamento.

## REFERÊNCIAS

- AGIS, H.; WATZEK, G.; GRUBER, R. Is zoledronate toxic to human periodontal fibroblasts? **J Dent Res.** v.89, n.1, p. 40-45. Jan 2010. doi: 10.1177/0022034509354298. PMID: 19948943.
- ALI-ERDEM, M. et al. Extraction socket healing in rats treated with bisphosphonate: animal model for bisphosphonate related osteonecrosis of jaws in multiple myeloma patients. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.** Valencia, v. 6, n. 7, p. 879-83. Nov 2011.
- ALMÃSAN, H. A. et al. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates. Discussion over 52 cases. **Rom J Morphol Embryol.** Craiova, v.52, n.4, p.1233-1241, May 2011.
- BI, Y. et al. Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. **Am J Pathol.** Philadelphia. v. 177, n. 1, p.280-290, May 2010. doi:10.2353/ajpath.2010.090592.
- CAPELLO, V. **Rabbit and Rodent dentistry:** Oral physiology. 1rd ed. Chichester: Wiley Blackwell. 2015.
- CHOI, S. C. The effects of topical application of bisphosphonates on replanted rat molars. **Dent Traumatol.** Denmark, v. 26, n. 6, p. 476-800. Dec 2010.
- CORREIA, V. F; CALDEIRA, C. L.; MARQUES, M. M. Cytotoxicity evaluation of sodium alendronate on cultured human periodontal ligament fibroblasts. **Dent Traumatol.** Copenhagen. v. 22, n. 6, p. 312-317. Dec 2006.
- FAGUNDES, D. J; TAHA, M.O. Modelos animais de doença: critério de escolhas e espécies

de animais de uso corrente. **Acta Cir Bras.** São Paulo, v. 19, n. 1, p. 59-65. Jan/Feb. 2004 em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502004000100010> .

FRANZONI, J. S. et al. Zoledronic acid and alendronate sodium and the implications in orthodontic movement. **Orthod Craniofac Res.** Oxford, v. 20, n. 3, p. 164-169. Aug. 2017.

HOKUGO, A. et al. Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecroses of the jaw with vitamin D deficiency in rats. **J Bone Miner Res.** New York, v. 25, p.1337-1349. June 2010. doi: 10.1002/jbmr.23

JACOBS, C. et al. Mechanical loading influences the effects of bisphosphonates on human periodontal ligament fibroblasts. **Clin. Oral Invest.** Berlin, v.1, n. 13, p. 699-708. April 2017.

KHOSLA, S. et al. 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, n. 10, p. 1479-1491, Oct 2007. doi:10.1359/jbmr.0707onj

KOMATSU, K. et al. Long-term effects of local pretreatment with alendronate on healing of replanted rat teeth. **J Periodont Res.** v. 43, n.2, p. 194-200. March 2008. doi: 10.1111/j.1600-0765.2007.01012.x

KOS, M. et al. Clinical comparison of patients with osteonecrosis of the jaws, with and without a history of bisphosphonates administration. **Int J Oral Maxillofac Surg.** Philadelphia, v. 39, n. 11, p. 1097-1102. Nov 2010. doi:10.1016/j.ijom.2010.04.054.

LEKIC, P. et al. Bisphosphonate modulates proliferation and differentiation of rat periodontal ligament cells during wound healing. **Anat Rec.** New York, v. 247, n. 3, p. 329–340. March 1997.

LUSTOSA-PEREIRA, A. et al. Evaluation of the topical effect of alendronate on the root surface of extracted and replanted teeth. Microscopic analysis on rats' teeth. **Dent Traumatol.** Copenhagen. v. 22, n. 1, p. 30-35. Feb 2006.

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, n. 11, p. 1567-1575, Nov 2005.

MARX, R. E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **J Oral Maxillofac Surg.** Philadelphia, v.61, n.9, p.1115-1117, Sept 2003.

MENGYU LI, et al. Decreased osteogenic ability of periodontal ligament stem cells leading to impaired periodontal tissue repair in BRONJ patients. **Stem Cell Develop.** Dec 2019. <https://doi.org/10.1089/scd.2019.0151>.

MORI, G.G.; et al. Effect of Zoledronic Acid Used in the Root Surface Treatment of Late Replanted Teeth: A Study in Rats. **Braz Dent J.** Ribeirão Preto, v. 21, n. 5, p. 452-457. Dec 2010.

OKAMOTO, Y. et al. High-dose zoledronic acid narrows the periodontal space in rats. **Int J Oral Maxillofac Surg.** Philadelphia, v. 42, n. 5, p. 627-631. May. 2013. doi:

10.1016/j.ijom.2012.11.011.

PATNTIRAPONG, S.; POOLGESORN, M. Alteration of macrophage viability, differentiation, and function by bisphosphonates. **Oral Diseases**. Houndmills, v. 24, n. 7, p.1294-1304. Oct 2018.

REID, I. R; BOLLAND, M. J; GREY, A. B. Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? **Bone**. Philadelphia, v. 41, p. 318-320, Sept 2007.

RODAN, G. A. Mechanisms of action of bisphosphonates. **Ann Rev Pharmacol Toxicol**. Palo Alto, v.38, p.375-88. Sep 1998.

ROELOFS, A. J.; THOMPSON, K.; GORDON, S.; ROGERS, M.J. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. **Clin Cancer Res**. Denville, v.15, n.20, p.6222-6230, Oct 2006.

RUGGIERO, S. L. et al. Osteonecrosis of the jaws associated with the use Bisphosphonates: a review 63 cases. **J Oral Maxillofac Surg**. Philadelphia, v. 62, n. 5, p. 527-534. May 2004.

RUGGIERO, S. L. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): initial discovery and subsequent development. **J Oral Maxillofac Surg**. Philadelphia, v.67, n.1, p.13-18, May 2009. doi: 10.1016/j.joms.2008.10.005.

RUSSELL, R. G. et al. Mechanism of action of Bisphosphonate: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. **Osteoporos Int**. London. v. 19. n. 6. p. 733-759. June 2008.

SASAKI, R. et al. Clinical efficacy of bisphosphonate therapy for bone metastasis from breast cancer. **Breast Cancer**. Tokyo, v. 10, n. 1, p. 28-32. Oct 2010.

SILVA, P. G. B.; et al. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. **Arch Oral Biol**. v. 60, p. 1237-1245, Sep 2015. doi:10.1016/j.archoralbio.2015.05.015. disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003996915001387?via%3Dihub>

SONG, M. Dental care for patients taking antiresorptive drugs: a literature review. **Restor Dent Endod**. Korea, v.44, n. 4, p. 42-44. Nov 2019. doi: 10.5395/rde.2019.44.e42.

SONIS, S. T.; et al. Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonated-related osteonecrosis in cancer patients. **Oral Oncol**. Oxford, v. 45, n. 2, p. 164-172, Feb 2008. doi:10.1016/j.oraloncology.2008.04.013.

YUKINORI, T. et al. In vitro cytotoxicity of zoledronate (nitrogen-containing bisphosphonate: NBP) and/or etidronate (non-NBP) in tumour cells and periodontal cells. **Arch Oral Biol**. Oxford, v. 56, n 6, p. 628-637. June 2013.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os bisfosfonatos são medicamentos amplamente utilizados para o tratamento de patologias do tecido ósseo e o seu uso está consolidado na literatura. O tratamento de desordens metabólicas como: osteopenia, osteoporose, doença de Paget e tumores metastáticos, geralmente envolve um longo período de tempo com uso dessas medicações em humanos. Além disso, essa classe de medicamentos está indicada para o tratamento de desordens não só em adultos como também em crianças com osteogênese imperfeita. Entretanto, os efeitos adversos do uso desses fármacos são inúmeros, destacando-se principalmente a osteonecrose da arcada óssea dentária, diminuição da capacidade angiogênica e toxicidade celular em diferentes sítios e tecidos.

Este trabalho, assim como outros revisados, procurou contribuir com informações associadas ao uso dos bisfosfonatos nas estruturas periodontais. Possivelmente, a limitação do número amostral, a terapia isolada e o curto período de terapia podem ter influenciado os resultados do estudo.

## REFERÊNCIAS

AGIS, H.; WATZEK, G.; GRUBER, R. Is zoledronate toxic to human periodontal fibroblasts?

**J Dent Res.** v.89, n.1, p. 40-45. Jan 2010. doi: 10.1177/0022034509354298. PMID: 19948943.

ALI-ERDEM, M. et al. Extraction socket healing in rats treated with bisphosphonate: animal model for bisphosphonate related osteonecrosis of jaws in multiple myeloma patients. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.** Valencia, v. 6, n. 7, p. 879-83. Nov 2011.

ALMĂȘAN, H. A. et al. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates. Discussion over 52 cases. **Rom J Morphol Embryol.** Craiova, v.52, n.4, p.1233-1241, May 2011.

BI, Y. et al. Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. **Am J Pathol.** Philadelphia, v. 177, n. 1, p.280-290, May 2010. doi:10.2353/ajpath.2010.090592

BLACK, D.M. et al. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. **N. Engl. J. Med.,** Boston, v.356, n.18, p.1809-1822, May 2007.

CAPELLO, V. **Rabbit and Rodent dentistry:** Oral physiology 1rd ed. Chichester: Wiley Blackwell.2015.

CHOI, S. C. The effects of topical application of bisphosphonates on replanted rat molars. **Dent Traumatol.** Denmark, v. 26, n. 6, p. 476-800. Dec 2010.

CORREIA, V. F; CALDEIRA, C. L.; MARQUES, M. M. Cytotoxicity evaluation of sodium alendronate on cultured human periodontal ligament fibroblasts. **Dent Traumatol.** Copenhagen. v. 22, n. 6, p. 312-317. Dec 2006.

COXON, J.P.; OADES, G.M.; KIRBY, R.S.; COLSTON, K.W. Zoledronic acid induces apoptosis and inhibits adhesion to mineralized matrix in prostate cancer cells via inhibition of protein prenylation. **BJU Int.** Oxford, v.94, n.1, p.164-170, July 2004.

CROUCHER, P.I. et al. Zoledronic acid treatment of 5T2MM-bearing mice inhibits the development of myeloma bone disease: evidence for decreased osteolysis, tumor burden and angiogenesis, and increased survival. **J Bone Miner Res.** New York, v.18, n.3, p.482-492, Mar. 2003.

FAGUNDES, D. J; TAHA, M.O. Modelos animais de doença: critério de escolhas e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cir Bras.** São Paulo, v. 19, n. 1, p. 59-65. Jan/Feb. 2004 em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502004000100010>.

FRANZONI, J. S. et al. Zoledronic acid and alendronate sodium and the implications in orthodontic movement. **Orthod Craniofac Res.** Oxford, v. 20, n. 3, p. 164-169. Aug 2017.

HOKUGO, A. et al. Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecroses of the jaw with vitamin D deficiency in rats. **J Bone Miner Res.** New York, v. 25, p.1337-1349. June 2010. doi: 10.1002/jbmr.23

JACOBS, C. et al. Mechanical loading influences the effects of bisphosphonates on human periodontal ligament fibroblasts. **Clin. Oral Invest.** Berlin, v.1, n. 13, p. 699-708. April 2017.

KHOSLA, S. et al. 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, n. 10, p. 1479-1491, Oct 2007. doi:10.1359/jbmr.0707onj

KOBAYASHI, Y. 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, n.2, p.165-175, March 2010. doi:10.1007/s00774-009-0128-9

KOMATSU, K. et al. Long-term effects of local pretreatment with alendronate on healing of replanted rat teeth. **J Periodont Res.** v. 43, n.2, p. 194-200. March 2008. doi: 10.1111/j.1600-0765.2007.01012.x

KOS, M. et al. Clinical comparison of patients with osteonecrosis of the jaws, with and without a history of bisphosphonates administration. **Int J Oral Maxillofac Surg.** Philadelphia, v. 39, n. 11, p. 1097-1102. Nov 2010. doi:10.1016/j.ijom.2010.04.054.

KOTH, V. S. et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: from the sine qua non condition of bone exposure to a non-exposed BRONJ entity. **Dentomaxillofac Radiol.** London, v. 45, n. 7, p.16-22. May 2016.

LEKIC, P. et al. Bisphosphonate modulates proliferation and differentiation of rat periodontal ligament cells during wound healing. **Anat Rec.** New York, v. 247, n. 3, p. 329–340. March 1997.

LUSTOSA-PEREIRA, A. et al. Evaluation of the topical effect of alendronate on the root surface of extracted and replanted teeth. Microscopic analysis on rats' teeth. **Dent Traumatol.** Copenhagen. v. 22, n. 1, p. 30-35. Feb. 2006.

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, n. 11, p. 1567-1575, Nov 2005.

MARX, R. E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **J Oral Maxillofac Surg.** Philadelphia, v.61, n.9, p.1115-1117, Sept 2003.

MENGYU LI, et al. Decreased osteogenic ability of periodontal ligament stem cells leading to impaired periodontal tissue repair in BRONJ patients. **Stem Cell Develop.** Dec 2019. <https://doi.org/10.1089/scd.2019.0151>.

METCALF, S.; PANDHA, H. S.; MORGAN, R. Antiangiogenic effects of zoledronate on cancer neovasculature. **Future Oncol.** London, v. 1, n. 11, p. 1325- 1333. Nov 2011.

MIGLIORATI, C. A. Bisphosphonate and oral cavity and avascular bone necrosis. **J Clin Oncol.** Alexandria, v. 21, n. 22, p. 4253-4254. Nov 2003.

MORI, G.G.; et al. Effect of Zoledronic Acid Used in the Root Surface Treatment of Late

Replanted Teeth: A Study in Rats. **Braz Dent J**. Ribeirão Preto, v. 21, n. 5, p. 452-457. Dec 2010.

OKAMOTO, Y. et al. High-dose zoledronic acid narrows the periodontal space in rats. **Int J Oral Maxillofac Surg**. Philadelphia, v. 42, n. 5, p. 627-631. May. 2013.doi: 10.1016/j.ijom.2012.11.011.

OYHANART SR, ESCUDERO, N.D. MANDALUNIS, PM. Effect of alendronate on the mandible and long bones: an experimental study in vivo. **Pediatr Res**. v. 78, p. 618-625.

PATNTIRAPONG, S.; POOLGESORN, M. Alteration of macrophage viability, differentiation, and function by bisphosphonates. **Oral Diseases**. Houndmills, v. 24, n.7, p.1294-1304. Oct 2018.

REID, I. R; BOLLAND, M. J; GREY, A. B. Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? **Bone**. Philadelphia, v. 41, p. 318-320, Sept 2007.

RODAN, G. A. Mechanisms of action of bisphosphonates. **Ann Rev Pharmacol Toxicol**. Palo Alto, v.38, p.375-88. Sep 1998.

ROELOFS, A. J.; THOMPSON, K.; GORDON, S.; ROGERS, M.J. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. **Clin Cancer Res**. Denville, v.15, n.20, p.6222-6230, Oct 2006.

RUGGIERO, S. L. et al. Osteonecrosis of the jaws associated with the use Bisphosphonates: a review 63 cases. **J Oral Maxillofac Surg**. Philadelphia, v. 62, n. 5, p. 527-534. May 2004.

RUGGIERO, S. L. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): initial discovery and subsequent development. **J Oral Maxillofac Surg**. Philadelphia, v.67, n.1, p.13-18, May 2009. doi: 10.1016/j.joms.2008.10.005.

RUSSELL, R. G. et al. Mechanism of action of Bisphosphonate: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. **Osteoporos Int**. London. v. 19. n. 6. p. 733- 759. June 2008.

SASAKI, R. et al. Clinical efficacy of bisphosphonate therapy for bone metastasis from breast cancer. **Breast Cancer**. Tokyo, v. 10, n. 1, p. 28-32. Oct 2010.

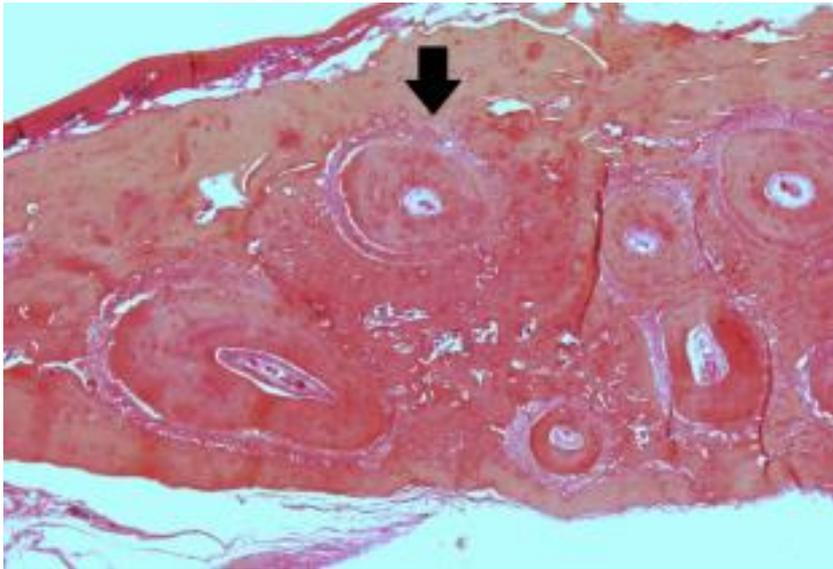
SILVA, P. G. B.; et al. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. **Arch Oral Biol**. v. 60, p. 1237-1245, Sept 2015. doi:10.1016/j.archoralbio.2015.05.015. disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003996915001387?via%3Dihub>

SONG, M. Dental care for patients taking antiresorptive drugs: a literature review. **Restor Dent Endod**. Korea, v.44, n. 4, p. 42-44. Nov 2019. doi: 10.5395/rde.2019.44.e42.

SONIS, S. T.; et al. Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonated-related osteonecrosis in cancer patients. **Oral Oncol**. Oxford, v. 45, n. 2, p. 164-172, Feb 2008. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.04.013.

YUKINORI, T. et al. In vitro cytotoxicity of zoledronate (nitrogen-containing bisphosphonate: NBP) and/or etidronate (non-NBP) in tumour cells and periodontal cells. **Arc Oral Biol.** Oxford, v. 56, n 6, p. 628-637. June 2013.

## APÊNDICE



**Figura 1-** Corte axial após a região de furca mostrando as raízes do primeiro molar superior direito do rato em aumento de 40x corado por Hematoxilina e Eosina. Seta em preto indicando a raiz eleita para estudo.



**Figura 2-** Corte axial da raiz mesio-palatina em aumento de 50x com os limites demarcados para mensuração do ligamento periodontal, corado por Hematoxilina e Eosina.

## ANEXO



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

### **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

**Projeto:** 120108

**Data da Versão do Projeto:** 01/05/2012

**Pesquisadores:**

DEISE PONZONI  
EDELA PURICELLI  
VIVIANE NEVES PACHECO  
RAFAEL SILVEIRA BRAGA  
ALESSANDRA JUNGES  
CARLOS EDUARDO E BARALDI  
ANGELO LUIZ FREDDO  
JULES RENAN DUTRA BEMFICA

**Título:** Terapia por bisfosfonato nitrogenado: avaliação em ratos da estrutura alveolar após exodontia.

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso-científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 24 de maio de 2012.

Dr. Alessandro Oswaldi  
Coordenador CEUA/HCPA