

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Ciências de Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Dissertação de Mestrado

Análise morfológica de dentes de ratos tratados com bisfosfonatos:
uma avaliação em microscopia eletrônica de varredura

Rebeca de Araujo Freitas

Brasília, 19 de novembro de 2019

Rebeca de Araujo Freitas

**Análise morfológica de dentes de ratos tratados com bisfosfonatos:
uma avaliação em microscopia eletrônica de varredura**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Paulo Tadeu de Sousa Figueiredo

Coorientadora: Aline Úrsula Rocha Fernandes

Brasília, 2019

Rebeca de Araujo Freitas

Análise morfológica de dentes de ratos tratados com bisfosfonatos:

uma avaliação em microscopia eletrônica de varredura

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Data da defesa:

Banca examinadora:

Prof. Dr. Paulo Tadeu de Sousa Figueiredo (Orientador)

Profa. Dra. Aline Úrsula Rocha Fernandes (Coorientadora)

Prof. Dr. Sasha Braun Chaves

Profa. Dra. Carla Ruffeil Moreira Mesquita

À minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fortalecer até o fim. Meu coração se enche de gratidão de tal modo que minhas palavras não são capazes de expressar. Quando tudo parecia contrário e desfavorável, Ele, como um amigo, me ouviu, e como um pai, supriu minhas necessidades e superou minhas expectativas. A Ele dou o meu louvor por todas as graças recebidas e expresso o meu maior agradecimento.

Aos meus pais, Sandro e Cristina, meus primeiros professores e maiores incentivadores. A vocês, meus verdadeiros heróis, devo cada uma das minhas conquistas. Grandes ou pequenas, difíceis ou fáceis, todas chegaram até mim através de vocês. Com a simplicidade de suas atitudes diárias e com a força de seus exemplos, ensinaram-me a buscar o meu melhor, superando ou, quando necessário, respeitando as minhas limitações. Salomão, em sua profunda sabedoria, declarou que “a glória dos filhos são os pais”. E que tamanha glória recebi! De vocês herdei os meus melhores atributos; com vocês aprendi os meus mais preciosos valores. Vocês me encorajaram dia após dia a buscar meus sonhos e não mediram esforços para me guiar em minha caminhada. Obrigada pelo o amor, em seu mais verdadeiro sentido, a mim oferecido. A vocês, de semelhante modo, eu dedico todo o meu amor e essa grande conquista!

À minha amada irmã, Juliana, por compartilhar cada momento da minha vida. Sua força, inteligência e sensibilidade a tornam o meu porto seguro, que me acolhe e me norteia. Com seu exemplo e suas atitudes, eu aprendi a obstinação. Sua dedicação, em tudo o que faz, me inspira e incentiva! Você é a certeza de que eu nunca estarei só. E como sou grata por tê-la! Obrigada pela cumplicidade e amizade inigualáveis, minha irmã. Eu te amo!

Ao meu cunhado, João Carlos, por tantos anos de amizade. Obrigada por sua dedicação à nossa família e pelo companheirismo de sempre.

Ao meu sobrinho, Ricardo, por iluminar e colorir meus dias. Com sua chegada, um sorriso sem dentes tornou-se o mais belo que já vi! Você é um presente em minha vida. Eu te amo e estarei sempre com você.

Ao meu namorado, Gabriel, por ser calma em meio a inquietude. Obrigada pelo amor, pela paciência, pelo companheirismo incondicional e pelas palavras de

encorajamento e paz quando delas precisei. Com você ao meu lado, tudo se tornou mais fácil e leve. Eu te amo!

Aos meus orientadores, Prof Dr Paulo Figueiredo e Profa Dra Aline Fernandes, por me guiarem no estreito e gratificante caminho da docência. Obrigada pela confiança e pela generosidade em ensinar, compartilhando, sem restrições, o conhecimento, bem tão valioso. Guardarei e transmitirei cada lição aprendida. A vocês, o meu profundo respeito e admiração.

Aos colegas Ms Túlio Lucena, Ms Taiana Lima, Ms Andréia Maria, Ms Raiza Querrer e Leonardo Nogueira pela dedicação à essa linha de pesquisa. Foi uma alegria trabalhar com cada um de vocês!

Aos professores Prof Dr Sasha Braun, Profa Dra Carla Ruffeil e Profa Dra Nilce por aceitarem compor a banca examinadora para defesa de mestrado. Muito obrigada pelo tempo oferecido e por suas importantes considerações.

À primeira turma de Mestrado em Odontologia da Universidade de Brasília pelo companheirismo e pela troca de conhecimentos ao longo desses anos. Agradeço pela amizade, a qual levarei por toda a vida.

À brilhante equipe de Diagnóstico Bucal do Departamento de Odontologia da Universidade de Brasília pelas contribuições para o enriquecimento deste trabalho.

Aos servidores da Universidade de Brasília, Ingrid Silva, do Laboratório de Microscopia e Microanálise do Instituto de Ciências Biológicas e Rafael Andrade, do Biotério de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências da Saúde, pela cooperação e presteza nas fases laboratoriais da pesquisa.

À Universidade de Brasília, corpo docente e demais servidores, grandes responsáveis pela formação que recebi. A vocês, minha eterna gratidão pelos anos de aprendizado, os quais marcaram a minha história.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho, o meu muito obrigada!

*“A mente que se abre para uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Oliver Wendell Holmes Sr.

RESUMO

Introdução: Bisfosfonatos (BFs) são drogas antirreabsortivas amplamente usadas na prevenção e no tratamento de doenças ósseas. Apesar dos benefícios dos BFs, diversos efeitos colaterais foram relatados. Além da osteonecrose dos maxilares relacionada à medicação (MRONJ), evento adverso mais discutidos na atualidade, os BFs são capazes de causar alterações dentárias, como atraso ou inibição da erupção dentária e malformações nessas estruturas. Assim, faz-se importante a pesquisa sobre os efeitos dos BFs nas estruturas radiculares. **Objetivos:** O presente estudo tem o objetivo de observar, de forma descritiva, os aspectos morfológicos radiculares de dentes molares de ratos Wistar submetidos a tratamento com bisfosfonato injetável (ácido zoledrônico) e tratados com ozonioterapia através de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura. **Metodologia:** No D0, 44 ratos Wistar machos com, aproximadamente, 60 dias de vida foram distribuídos, de forma aleatória simples, em dois grupos (n=22): tratamento com bisfosfonato (grupo Z) e controle (grupo C). Cada grupo foi subdividido em dois subgrupos (n=11): tratamento com ozonioterapia (grupo OZ) e sem tratamento (grupo ST). No D12, os animais dos grupos ZOZ e COZ passaram a receber ozonioterapia (20µg/ml), via insuflação retal, na dose de 5ml, 2x/semana, durante 9 semanas. No D21, iniciou-se a terapia com bisfosfonato (4mg/100ml) dos grupos ZOZ e ZST, via injeção intraperitoneal, na dose de 66µg/kg, 1x/semana, por 8 semanas. Já os grupos COZ e CST seguiram o mesmo protocolo, porém, com injeção de soro fisiológico. No D42, coincidindo com a quarta semana de terapia medicamentosa, foram extraídos os primeiros molares inferiores esquerdos de todos os animais. O processamento das amostras consistiu em metalização da face dentária com maior área de exposição radicular para análise no microscópio eletrônico de varredura (MEV). Para todas as amostras, foram geradas imagens com os aumentos de 15, 85 e 200 vezes. **Resultados:** Foram identificadas reabsorções rasas na superfície do cimento nos grupos ZST, COZ e CST, predominantemente, no terço cervical radicular; regiões craqueladas, em diferentes comprimentos e profundidades, nas superfícies radiculares de todos os grupos, predominantemente, em áreas de furca e corpo radicular; e cimento das porções mais próximas ao ápice radicular de todos os grupos com uma estrutura mais rugosa e volumosa, quando comparado ao cimento de corpo radicular. Além disso, em todos os grupos, ocorreram fraturas radiculares com envolvimento total de uma ou mais raízes. **Conclusão:** Não existem indícios suficientes de que a administração periódica de BFs possa causar alterações morfológicas na topografia radicular de dentes molares de ratos, ao menos superficialmente. Adicionalmente, a ozonioterapia não se mostrou benéfica ou maléfica para a integridade da superfície radicular. Assim, novas pesquisas são necessárias para estabelecer-se definitivamente a segurança na utilização dos BFs para as estruturas dentárias.

Palavras-chave: bisfosfonatos; hiper cementose; microscopia eletrônica de varredura; morfologia; osteonecrose por bisfosfonatos; ozonioterapia; raiz dentária; reabsorção radicular.

ABSTRACT

Introduction: Bisphosphonates (BFs) are anti-resorptive drugs widely used in the prevention and treatment of bone diseases. Despite the benefits of BFs, several side effects have been reported. In addition to Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ), the most widely discussed adverse event today, BFs are capable of causing dental changes such as delay or inhibition of tooth eruption and malformations in these structures. Thus, research on the effects of BFs on root structures is important. **Objectives:** The aim of the present study is to observe, descriptively, the root morphological aspects of molar teeth of Wistar rats submitted to treatment with injectable bisphosphonate (zoledronic acid) and treated with ozone therapy through scanning electron microscopy images. **Methodology:** At D0, 44 male Wistar rats, approximately 60 days old, were randomly assigned to two groups (n = 22): bisphosphonate treatment (group Z) and control (group C). Each group was subdivided into two subgroups (n = 11): treatment with ozone therapy (OZ group) and no treatment (ST group). In D12, animals from the ZOZ and COZ groups started receiving ozone therapy (20µg/ml) via rectal insufflation at a dose of 5ml, twice a week for 9 weeks. In D21, bisphosphonate therapy (4mg/100ml) of the ZOZ and ZST groups was initiated via intraperitoneal injection at a dose of 66µg/kg once a week for 8 weeks. The COZ and CST groups followed the same protocol, however, with saline injection. At D42, coinciding with the fourth week of drug therapy, the left lower first molars were extracted from all animals. The processing of the samples consisted of metallization of the dental surface with larger area of root exposure for analysis by scanning electron microscope (SEM). For all samples, images were generated with increases of 15, 85 and 200 times. **Results:** Shallow resorption on the cementum surface was identified in the groups ZST, COZ and CST, predominantly in the root cervical third; cracked regions, at different lengths and depths, on the root surfaces of all groups, predominantly in furcation and root body areas; and cementum of the portions closest to the root apex of all groups with a rougher and voluminous structure when compared to the root body cementum. Moreover, in all groups, root fractures occurred with total involvement of one or more roots. **Conclusion:** There is insufficient evidence that BFs periodic administration may cause morphological changes in the root topography of rat molar teeth, at least superficially. Additionally, ozone therapy did not prove beneficial or harmful to root surface integrity. Thus, further research is needed to definitively establish the safe use of BFs for dental structures.

Keywords: bisphosphonate; bone avascular necrosis/avascular necrosis of bone; hypercementosis; morphology; ozone therapy/ozone; root resorption/resorptions; scanning electron microscopy; tooth root.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Cronologia da odontogênese e rizogênese murina

Figura 2 – Ilustração da relação entre maxila e mandíbula murinas e estrutura dos dentes incisivos superiores e inferiores

Figura 3 – Estrutura de um dente molar murino

Figura 4 – Aspectos anatômicos dos dentes murinos no contexto do crânio (A) e em corte longitudinal (B) para demonstrar suas relações com o tecido ósseo alveolar e com os incisivos

Figura 5 – Gerador de O3 medicinal e cilindro de oxigênio medicinal

Figura 6 – Ozonioterapia por insuflação retal

Figura 7 – Procedimentos para realização das exodontias e medicações. A: Anestesia; B: Fixação do animal a mesa operatória e manutenção da abertura bucal; C: Antissepsia extraoral; D: Antissepsia intraoral; E: Descolamento de tecidos moles; F: Luxação dentária; G: Remoção do dente do alvéolo; H: Sutura finalizada; I: Molar extraído; J: Administração do analgésico

Figura 8 – Linha do tempo da pesquisa

Figura 9 – Visão corono-radicular em MEV dos primeiros molares inferiores esquerdos extraídos do grupo ZOZ. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Aumento: 15X

Figura 10 – Visão corono-radicular em MEV dos primeiros molares inferiores esquerdos extraídos do grupo ZST. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Aumento: 15X

Figura 11 – Visão corono-radicular em MEV dos primeiros molares inferiores esquerdos extraídos do grupo COZ. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Aumento: 15X

Figura 12 – Visão corono-radicular em MEV dos primeiros molares inferiores esquerdos extraídos do grupo CST. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Aumento: 15X

Figura 13 – Ápices radiculares dos primeiros molares inferiores esquerdos extraídos do grupo ZOZ. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Aumento: 85X

Figura 14 – Ápices radiculares dos primeiros molares inferiores esquerdos extraídos do grupo ZST. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Aumentos: 1-9=85X; 11=200X

Figura 15 – Ápices radiculares dos primeiros molares inferiores esquerdos extraídos do grupo COZ. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Aumento: 85X

Figura 16 – Ápices radiculares dos primeiros molares inferiores esquerdos extraídos do grupo CST. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Aumento: 85X

Figura 17 – Corpos radiculares dos primeiros molares inferiores esquerdos extraídos do grupo ZOZ. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Aumentos: A, B, C, I e J=85X; D=170X; E e G=200X; F e H=850X

Figura 18 – Corpos radiculares dos primeiros molares inferiores esquerdos extraídos do grupo ZST. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Aumento: 85X

Figura 19 – Corpos radiculares dos primeiros molares inferiores esquerdos extraídos do grupo COZ. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Aumento: 85X

Figura 20 – Corpos radiculares dos primeiros molares inferiores esquerdos extraídos do grupo CST. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Aumento: 85X

Figura 21 – Perdas estruturais compatíveis com reabsorções dentárias na superfície do cimento nos grupos ZST, COZ e CST, respectivamente. A: Grupo ZST; setas indicam reabsorções superficiais de bordos irregulares adjacentes a uma trinca radicular longitudinal, provocada, provavelmente, por forças de luxação durante a exodontia. B: Grupo COZ; setas indicam reabsorções de bordos irregulares ainda mais rasas. C: Grupo CST; setas indicam reabsorções de bordos irregulares adjacentes à junção cimento-esmalte. D: Grupo CST; imagem C em maior aumento. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Imagens obtidas em MEV. Aumentos: A=200X, B e C=85X e D=600X

Figura 22 – Regiões craqueladas nas superfícies radiculares em áreas de furca e corpo radicular nos grupos tratados com bisfosfonatos. Imagens A (200X), B (85X) e C (200X) representam o grupo ZOZ e as imagens D (85X), E (85X), F (200X), G (200X) e H (850X), o grupo ZST

Figura 23 – Regiões craqueladas nas superfícies radiculares em áreas de furca e corpo radicular no grupo COZ. Aumentos: A, B, D, E e G=85X; C e F=200X

Figura 24 – Regiões craqueladas nas superfícies radiculares em áreas de furca e corpo radicular no grupo CST. Aumentos: A, B, C, D, E, F e G=85X e H=95X

Figura 25 – Detalhes da topografia radicular dos dentes obtidos do grupo ZOZ. Aumentos: A, B, C, H, J, K, N, P, Q, S e U=200X; D, I, L, M, O, R e T=850X; E=3000X; F=600; G=550

Figura 26 – Detalhes da topografia radicular dos dentes obtidos do grupo ZST. Aumentos: A, B, D, E, F e G=200X; C e H=850X

Figura 27 – Detalhes da topografia radicular dos dentes obtidos do grupo COZ. Aumentos: A, B, C, I e K=85X; D, E, F, G, H, J e L=200X

Figura 28 – Detalhes da topografia radicular dos dentes obtidos do grupo CST. Aumentos: A, E, F, G, H, I, J, L, M, N e O=85X; B e C=200X; D=850X; K=95X

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 – Distribuição dos grupos

Tabela 2 – Número de dentes obtidos

Quadro 1 – Peso (g) de cada animal, dose (ml) de Zometa administrada aos grupos ZOZ e ZST e dose (ml) de soro fisiológico administrado aos grupos COZ e CST nas quatro primeiras semanas. M = morte do rato por complicações; F = rato fêmea

Quadro 2 – Peso (g) de cada animal, dose (ml) de Zometa administrada aos grupos ZOZ e ZST e dose (ml) de soro fisiológico administrado aos grupos COZ e CST nas quatro primeiras semanas. M = morte do rato por complicações; F = rato fêmea

Quadro 3 – Peso (g) de cada animal, dose (ml) de Quetamina e Xilazina administradas aos grupos ZOZ, ZST, COZ e CST previamente às exodontias. M = morte do rato por complicações; F = rato fêmea

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	BISFOSFONATOS	25
1.2	EFEITOS ADVERSOS DOS BISFOSFONATOS	27
1.3	CEMENTO DENTÁRIO	31
1.4	O RATTUS NORVEGICUS.....	33
1.5	OBJETIVOS.....	38
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	39
3	METODOLOGIA	47
3.1	DESCRIÇÃO, OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	47
3.2	DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS	47
3.3	OZONIOTERAPIA.....	48
3.4	TERAPIA COM BISFOSFONATO	49
3.5	EXODONTIAS.....	49
3.6	EXAMES FÍSICOS E EUTANÁSIA	52
3.7	PERDAS	52
3.8	PROCESSAMENTO E ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	52
4	RESULTADOS.....	55
5	DISCUSSÃO	73
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
7	REFERÊNCIAS	85
8	PRESS RELEASE	91
	APÊNDICES	93
	ANEXOS	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 BISFOSFONATOS

Bisfosfonatos (BFs) são drogas antirreabsortivas amplamente usadas para prevenir, curar ou aliviar doenças causadoras de deficiência óssea (1,2). São análogos sintéticos do pirofosfato inorgânico, um regulador endógeno da renovação óssea que inibe a reabsorção óssea e a mineralização *in vitro* (2,3).

Apesar de terem sido sintetizados no final do século XIX, os BFs passaram a ser usados clinicamente apenas nas últimas 5 décadas (2,4). Passados 50 anos desde o primeiro uso clínico de um BF (etidronato dissódico em 1968), é importante lembrar que a origem desses medicamentos vem da pesquisa odontológica (4,5). Embora a pesquisa com BFs tenha se concentrado originalmente nos usos para remover o cálculo dentário, nos últimos anos essa classe de medicamentos cresceu na medicina (2). Hoje, os BFs continuam a fazer parte da rotina odontológica, especialmente devido aos efeitos colaterais que podem afetar as estruturas orais.

O etidronato obteve aprovação regulamentar em 1977 para várias indicações, incluindo doença de Paget e hipercalcemia de malignidade (4). Hoje, sete BFs são aprovados para uso nos Estados Unidos (2).

Os BFs representam uma classe importante de drogas antirreabsortivas indicadas para a prevenção e tratamento da osteoporose, hipercalcemia maligna, mieloma múltiplo, doença de Paget, metástases ósseas associadas a câncer de mama, próstata e pulmão, osteogênese imperfeita, displasia fibrosa, doença de Gaucher, hiperparatireoidismo primário e outras condições que resultam em fragilidade óssea (2,6–10). Além disso, os BFs foram recentemente introduzidos como coadjuvantes no tratamento da doença periodontal (11).

Na oncologia, os BFs são usados como adjuvantes da terapia antineoplásica, gerenciando complicações da disseminação metastática óssea, incluindo dor, hipercalcemia e fratura patológica (12). Nos pacientes afetados, ele efetivamente retorna a densidade mineral óssea, reduz a incidência de fraturas ósseas e melhora sua qualidade de vida (5,6,13).

Para o tratamento da osteoporose, doença na qual um desequilíbrio na remodelação óssea resulta em ossos de menor densidade e qualidade, os BFs podem

ser administrados por via oral (diariamente, semanalmente ou mensalmente) ou por via intravenosa (a cada três meses ou anualmente), reduzindo o risco de fraturas (14,15). Vários ensaios clínicos controlados randomizados de larga escala e longo prazo mostraram que os BFs reduzem o risco de fraturas de estruturas ósseas, como vértebras e quadril, em mulheres pós-menopausadas com osteoporose (15).

Existem numerosos tipos de BFs aprovados para uso no ambiente clínico, os quais diferem com base nas alterações estruturais da chamada cadeia lateral R-2, diferenciando os dois tipos de BFs: nitrogenados e não-nitrogenados. Os BFs que contêm nitrogênio são muito mais potentes na inibição da reabsorção óssea in vivo do que os BFs não-nitrogenados (2,10). Etidronato, clodronato e tiludronato são alguns exemplos de BFs não-nitrogenados. Já o alendronato, o zoledronato, o ibandronato, o pamidronato e o risedronato são BFs nitrogenados (14). Cada droga apresenta diferentes características químicas, físico-químicas e biológicas, o que significa que os resultados obtidos em termos da ação de um composto não podem ser extrapolados para outros.

Alguns BFs possuem atividade antiangiogênica, a qual pode contribuir para o efeito antirreabsortivo, bem como para o efeito antitumoral (3,16). Os BFs intravenosos, como o pamidronato e o zoledronato, são usados em pacientes com condições relacionadas ao câncer, como mieloma múltiplo, câncer de mama metastático, metástases ósseas de outros tumores sólidos e hipercalcemia de malignidade. BFs orais, como alendronato, ibandronato e risedronato, são usados para o tratamento de osteoporose, osteopenia, doença óssea de Paget e osteogênese imperfeita da infância (3,10).

Os BFs têm alta afinidade pela hidroxiapatita e são resistentes ao metabolismo pelas fosfatases endógenas (3). Eles são preferencialmente incorporados em locais de remodelação óssea ativa, como comumente ocorre em condições caracterizadas pela renovação acelerada do esqueleto, e atuam, entre outros aspectos, inibindo a ligação dos osteoclastos à matriz óssea, reduzindo ou inibindo sua atividade e aumentando sua apoptose. Desse modo, a degradação da hidroxiapatita é inibida, suprimindo a reabsorção óssea (14).

BFs contendo nitrogênio se ligam à hidroxiapatita em superfícies ósseas, que, por sua vez, são reabsorvidas por osteoclastos (14). Assim, são internalizados em osteoclastos via endocitose, resultando na inibição de sua atividade (14,17) Os BFs absorvidos pelos osteoclastos durante a reabsorção óssea inibem a enzima

farnesilpirofosfatossintase, uma enzima chave na via do mevalonato. Metabólitos produzidos nessa via são proteínas reguladoras importantes para a membrana celular, necessária para a função dos osteoclastos (14,17,18). Dessa forma, os BFs induzem eventos bioquímicos capazes de iniciar a apoptose dos osteoclastos, forma de morte na qual as células são destruídas por fragmentação estrutural sem derramamento enzimático ou molecular que induza à inflamação. Assim, os BFs contribuem no controle de um turnover ósseo acelerado, prevenindo a osteopenia e a osteoporose (6,12,19,20)

Já os BFs não-nitrogenados são incorporados ao trifosfato de adenosina, fazendo com que ele seja resistente à hidrólise (21). A acumulação desse metabólito não-hidrolisável contendo adenina eventualmente leva à morte celular dos osteoclastos (22).

Entretanto, os efeitos dos BFs na reabsorção óssea podem não ser devidos à sua ação direta apenas nos osteoclastos. Há evidências de que eles estimulam a proliferação de células precursoras dos osteoblastos (23) e a produção de osteoprotegerina pelos osteoblastos (24), uma proteína antirreabsorção. No entanto, os mecanismos que envolvem os osteoblastos ainda não são bem compreendidos (5,6,18).

Aproximadamente 50% do BF se acumula no osso, enquanto os 50% restantes são excretados inalterados pelos rins. Quando incorporados ao osso, os BFs podem permanecer por vários anos, geralmente em uma forma farmacologicamente inativa. Eventualmente, eles são liberados do osso e reabsorvidos pelos osteoclastos, que os redistribuem dentro do osso (5,10).

1.2 EFEITOS ADVERSOS DOS BISFOSFONATOS

Apesar dos efeitos benéficos dos BFs e embora sejam bem tolerados, efeitos adversos, como intolerância gastrointestinal, hipocalcemia, reação em fase aguda e disfunção renal, foram relatados (12). Além disso, efeitos colaterais indesejáveis foram observados na região oral, afetando, em especial, estruturas ósseas e dentárias (10,13).

Um número crescente de pacientes em uso dessa classe de medicamentos por longo prazo e em altas doses tem desenvolvido a osteonecrose dos maxilares, um

dos eventos adversos mais discutidos na atualidade (13,25). Marx (26), no ano de 2003, em uma carta ao editor, alertou sobre a ocorrência de osteonecrose em mandíbula e maxila de pacientes que fizeram uso de pamidronato e zoledronato. Esse foi o primeiro relato associando os medicamentos com tal condição. Posteriormente, em 2005, Marx publicou uma série de casos relatando essa associação (27). Desde então, milhares de casos de osteonecrose dos maxilares foram relatados em todo o mundo (17,27,28), uma condição que tem recebido grande atenção na literatura odontológica (18).

Essa condição foi primeiramente descrita pela *American Society for Bone and Mineral Research* (ASBMR) como BRONJ, sigla em inglês para *Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw*. Sua definição inicial foi “área de exposição óssea em região maxilofacial, que não se cura em até 8 semanas, depois de identificada pela equipe de saúde, em paciente que recebeu ou foi exposto a BF e que não tenha recebido radiação na região” (29,30). Entretanto, em 2014, a Academia Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais (AAOMS) (7) atualizou a definição, relacionando-a com uso de medicações antirreabsortivas e antiangiogênicas, presença de fístulas ou úlceras intra ou extra-orais, presença de sequestros ósseos e ausência de histórico de metástase óssea na região, dando outra denominação à condição: *Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw* (MRONJ).

A MRONJ é um distúrbio caracterizado pela ruptura da arquitetura e organização óssea normal. As lesões tem uma aparência irregular, onde áreas múltiplas e parcialmente confluentes de osso necrótico são misturadas com resíduos ósseos vitais. Acredita-se que a alteração estrutural do MRONJ é atribuída ao comprometimento parcial da vascularização (31). Nessa condição, o tecido ósseo da mandíbula muitas vezes não cicatriza após um pequeno trauma, embora também possa ocorrer espontaneamente (7). No entanto, em 90% dos casos, é causada por algum tipo de tratamento odontológico (30).

A mandíbula é um osso em constante atividade, com um alto grau de estresse mecânico por forças mastigatórias. Esse estresse mecânico acarreta em trincas e até em regiões necróticas locais. Em um osso normal, essas microfissuras são reparadas continuamente. Porém, em um ambiente de remodelação óssea comprometido, isso pode levar ao acúmulo de microdanos, à fragilidade óssea aumentada e, conseqüentemente, à destruição local do tecido ósseo, vascular e conjuntivo (16).

A MRONJ é caracterizada pelo desenvolvimento de necrose dos maxilares e é tradicionalmente apresentada com áreas de exposições ósseas necróticas através de fenestrações nas mucosas ou na pele, variando de poucos milímetros a vários centímetros (32). Estudos mais recentes relatam que em aproximadamente 25% dos casos a ONJ também pode se apresentar sem fenestração de tecido (variante não exposta), com pacientes afetados relatando sintomas dolorosos sem explicação aparente, fístulas intra ou extraorais, mobilidade dentária, perda de dentes, sinusite ou fratura mandibular (7). Ambas as variantes expostas e não expostas de MRONJ podem se apresentar com extensa necrose, infecção secundária e dor intensa, causando, portanto, uma redução significativa na qualidade de vida (33).

Um dos aspectos patológicos importantes do MRONJ é a imunossupressão local pelos BFs de monócitos e macrófagos (34). Além disso, uma notável ausência de células inflamatórias, elementos medulares normais ou células adiposas foi observada no estudo de Marx & Tursun (35). O principal problema em um sistema imunológico localmente comprometido é a diminuição da vascularização, que normalmente permitiria a migração efetiva de macrófagos para o osso afetado (34,35). Em contraste, a vascularização periosteal permanece praticamente intacta em pacientes com MRONJ (36).

O BF ligado a sítios ósseos é liberado durante a reabsorção e absorção pelos osteoclastos. Após tomar alendronato por 5 anos, por exemplo, os marcadores de reabsorção e formação óssea são descritos como permanecendo suprimidos por, pelo menos, 5 anos após a descontinuação. A maioria dos casos relatados de MRONJ da mandíbula envolve BFs intravenosos, como pamidronato e zoledronato, mas também parece haver risco de MRONJ com o uso de medicação oral (16).

Diversos grupos de pesquisa e sociedades médicas publicaram recentemente recomendações ou diretrizes sobre estratégias de prevenção, estadiamento e manejo do MRONJ. Em geral, o tratamento conservador, como administração de antibióticos e irrigação local, é recomendado para MRONJ. No entanto, em caso de avanço da doença, a intervenção cirúrgica é necessária (7).

Um aspecto do paciente de grande relevância é a idade. Pacientes com quadro de MRONJ são, geralmente, idosos com história de metástase óssea ou doença reumática, quase sempre com história de dor. Quando a função renal do paciente diminui, a administração repetida de antibióticos e analgésicos antiinflamatórios deve ser evitada. O manejo cirúrgico conservador, que visa controlar a infecção local e

resulta em alívio da dor, é uma importante opção de tratamento, a qual pode ser uma alternativa à administração repetitiva de analgésicos, especialmente em pacientes idosos (36,37).

Informações sobre a prevalência e a incidência de MRONJ variam muito e permanecem controversos. Dados disponíveis sugerem que o MRONJ se desenvolve em aproximadamente 0% a 0,04% daqueles que usam BFs orais para o tratamento da osteoporose (38). Outro estudo, de modo semelhante, apontou que a incidência de MRONJ em pacientes em uso de BFs orais para osteoporose varia, sendo geralmente inferior a 0,5% (7). Já a incidência de MRONJ em pacientes oncológicos expostos ao zoledronato é maior: até 6,7% (7). Um terceiro estudo apontou que a incidência de MRONJ em pacientes com osteoporose e oncologia é de 0,001 a 0,1 e de 1 a 15%, respectivamente (39).

Vidal-Gutiérrez, em trabalho publicado no ano de 2017 (30), reafirmou que a maioria dos casos de MRONJ foi relatada em pacientes que receberam tratamento intravenoso prolongado de zoledronato. De acordo com ele, MRONJ é raro em pacientes em uso de BFs orais para osteoporose, estimando-se entre 0,001% e 0,1% (30). Mesmo assim, estudos recentes revelaram um aumento no número de casos de MRONJ, possivelmente devido à implementação de novos medicamentos (8,25,40). Essa associação tem ofuscado os potenciais benefícios dos BFs em relação à implantodontia, ortodontia, saúde periodontal e patologia dos maxilares (7,18).

Culturas de células da medula óssea obtidas a partir da mandíbula demonstraram a internalização de mais BFs quando comparadas com culturas de ossos longos. Isso sugere que os osteoclastos presentes na mandíbula são mais suscetíveis à atividade dos BFs, o que poderia explicar por que a MRONJ ocorre exclusivamente nos ossos maxilares (41).

Mesmo assim, pouca informação está disponível sobre a etiopatogenia da MRONJ. Da mesma forma, não está claro por que a MRONJ se desenvolve apenas em um subconjunto de pacientes, permanecendo difícil prever quais indivíduos serão acometidos. A farmacogenética tem o potencial de identificar variantes genéticas associadas a um risco aumentado (susceptibilidade) de desenvolver MRONJ. Diversos estudos genéticos foram realizados durante os últimos anos; no entanto, eles são limitados pelo tamanho pequeno da coorte e pela falta de significância estatística genômica robusta (17).

Vários fatores de risco clínicos têm sido associados ao desenvolvimento de MRONJ, incluindo doença maligna subjacente, uso de BFs endovenosos de alta potência, alta dose ou longa duração da terapia, uso de medicações concomitantes, infecções dentárias e procedimentos cirúrgicos para os maxilares (42). No entanto, a literatura relacionada não tem robustez e consistência, sendo escassas as informações sobre a incidência, patogênese, estratégias de tratamento e prevenção de tal condição.

Além da MRONJ, os BFs são capazes de causar vários tipos de alterações dentárias. Como outro efeito colateral observado na região oral, foi demonstrado que o tratamento com BFs durante a odontogênese atrasa ou inibe a erupção dentária e que pode acarretar em uma variedade de malformações nessas estruturas (43).

Sabendo disso e, adicionalmente, que a formação da dentição decídua começa antes do nascimento, e a da dentição permanente, exceto os terceiros molares, é completada em aproximadamente 15 a 16 anos de idade em humanos, Hiraga et al (13) examinou os efeitos da administração de BF durante a odontogênese na formação e erupção dentária em ratos. Como a formação e erupção são acompanhadas de reabsorção óssea, esperava-se que a administração de BFs nesse período afetasse o desenvolvimento dentário. Os resultados obtidos confirmaram que o tratamento com BFs durante a odontogênese tem o potencial de inibir a erupção, prejudicar a formação dentária e induzir vários tipos de anormalidades nos dentes. No entanto, as evidências clínicas para apoiar os resultados ainda são limitadas.

Numerosos estudos já foram previamente realizados em ratos, mas seus resultados foram inconsistentes devido a aplicação de protocolos diferentes. Além disso, em estudos anteriores, seus achados não são confiáveis e comparáveis, de modo que o desenvolvimento de um modelo animal experimental de fácil replicação é necessário (30). Isso ajudará a entender a fisiopatologia das alterações ósseas e dentárias associadas aos BFs e, eventualmente, estabelecer estratégias preventivas e o melhor tratamento para essas alterações.

1.3 CEMENTO DENTÁRIO

O cimento é um tecido mineralizado que recobre toda a superfície da raiz. A principal função do cimento é o suporte dentário ou ancoragem dentária em conjunto

com as principais fibras e osso alveolar (44). De acordo com Denton (45), o cimento foi demonstrado pela primeira vez microscopicamente por Fraenkel & Raschkow (1835) e Retzius (1836), e desde então se tornou uma parte do conhecimento geral em odontologia.

Dos três tecidos duros encontrados nos dentes humanos, o cimento foi o último a ser descoberto, muito depois do amplo reconhecimento das camadas de esmalte e dentina. Isto é, em grande parte, devido ao seu pequeno tamanho e estreita relação anatômica com a dentina radicular (46).

O cimento existe fundamentalmente nos dentes dos mamíferos, os quais se encaixam nas cavidades alveolares do osso alveolar, funcionando como um dispositivo de suporte dos dentes em conjunto com as principais fibras periodontais e o osso alveolar (44). Ou seja, ele fornece ligação entre a raiz propriamente dita, o ligamento periodontal adjacente (PDL) e o osso alveolar (47,48).

De acordo com Yamamoto et al (44), em seu minucioso trabalho sobre histologia, função, estrutura e desenvolvimento do cimento humano, o qual foi publicado no ano de 2016”:

A matriz orgânica do cimento é constituída predominantemente por colágeno. No cimento bovino, o colágeno tipo I representa mais de 90% da matriz orgânica e o colágeno tipo III, aproximadamente, 5%. No cimento humano, o colágeno tipo I parece ser o único tipo de colágeno. O colágeno forma fibrilas transversais no cimento e induz a mineralização biológica, atuando como arcabouço para os cristais durante a mineralização. Além disso, mantém a integridade estrutural do cimento após a mineralização

A matriz orgânica do cimento possui, ainda, proteínas não-colagenosas e proteoglicanos em sua composição. As principais proteínas não-colagenosas são a sialoproteína óssea e a osteopontina, as quais desempenham papéis importantes no processo de mineralização, ligando fibrilas de colágeno e hidroxiapatita. Após a mineralização, servem para manter a integridade estrutural do cimento.

O cimento contém dois tipos de fibras: extrínsecas (Sharpey), as quais são extremidades embutidas das fibras principais, e intrínsecas, que são fibras próprias do cimento. Acredita-se que as fibras extrínsecas sejam secretadas por fibroblastos e parcialmente por cementoblastos e que as fibras intrínsecas sejam secretadas exclusivamente por cementoblastos.

Fazendo um paralelo, os dentes humanos apresentam dois tipos principais de cimento, o cimento celular e o acelular, que são distintos em composição, localização e função.

O cimento acelular, mais fino, ancora as fibras principais do ligamento periodontal à superfície da raiz cervical e é fundamental para a fixação do dente e para a função periodontal. O cimento celular, mais espesso, envolve a porção apical da raiz e fornece um papel adaptativo na manutenção do dente em sua posição oclusal. Além disso, a classificação em celular ou acelular é dada pela inclusão ou não inclusão de cementócitos.

A principal função do cimento é o suporte dentário ou ancoragem dentária em conjunto com as principais fibras e osso alveolar. O cimento acelular é, portanto, o

cimento mais adequado para suporte dentário. A função do cimento celular é mais complicada, pois não parece contribuir para o suporte dentário. Em vez disso, sua função é a adaptação, ou seja, remodelar a superfície da raiz durante o movimento dentário e compensar o desgaste da coroa. Ele também aparece como cimento reparador que preenche superfícies radiculares reabsorvidas.

O cimento celular é geralmente mais espesso nos molares que nos anteriores. A razão pode ser deduzida simplesmente: a espessura do cimento celular é paralela ao estresse mastigatório aplicado no dente.

O cimento é, muitas vezes, referido como um tecido semelhante ao osso. No entanto, esse tecido é avascular, não sofre remodelação dinâmica e tem sua espessura aumentada ao longo da vida. Nestes pontos, o cimento é marcadamente diferente do osso.

O conhecimento da histologia do cimento foi aprimorado com o avanço dos equipamentos e das técnicas de investigação. A maioria dos dados foi obtida através de estudos com roedores, como o rato e o camundongo. Assim, relatos anteriores sobre histologia do cimento humano continham algumas descrições questionáveis, provavelmente devido à comparação incorreta do cimento humano e dos roedores.

Por esse motivo, apesar das dificuldades no delineamento do estudo, é importante a pesquisa em humanos na busca de entender melhor os efeitos dos BFs na formação e na modificação das estruturas radiculares.

Uma vez que os bisfosfonatos comprovadamente aumentam a densidade de mineralização (19) e causam alterações nos ossos maxilares (MRONJ), faz-se necessária a investigação de seus possíveis efeitos nas raízes dentárias neles implantadas. Analisando aspectos da formação estrutural do cimento após o tratamento com altas concentrações de BFs, pode-se obter parte da resposta.

1.4 O RATTUS NORVEGICUS

De acordo com Guvva et al (49), em sua pesquisa sobre o uso de ratos de laboratório como modelo animal em periodontia, publicada no ano de 2018 e aqui traduzida:

O rato de laboratório, *Rattus norvegicus*, é um roedor da família Muridae. Ratos selvagens originaram-se nas regiões temperadas da Ásia Central, do sul da Rússia ao norte da China. Através da migração ao longo do comércio e rotas militares, o rato cosmopolita se espalhou pelo mundo.

Em meados dos anos 1800, os ratos passaram a ser usados em experimentos científicos, estando agora disponíveis em diversas variedades ecológicas e genéticas. É uma das espécies mais utilizadas de animais de laboratório, sendo usados principalmente para pesquisas em toxicologia, nutrição, comportamento e câncer.

A dentição típica dos roedores é incisivo 1/1, canino 0/0, pré-molar 0/0 e molares 3/3. Os incisivos, em formato de cinzel, não possuem raízes e tem erupção contínua. Os 12 molares são usados para trituração. As bochechas se fecham no

diastema, separando os incisivos da cavidade oral. Têm uma sínfise mandibular articulada e a estrutura da área gengival é bastante semelhante à observada em humanos. Um rato adulto pesa cerca de 530-900 gramas, possui uma cabeça afilada, uma cauda longa e um ânus geralmente pressionado no chão.

Maynard & Downes (50), durante o estudo da anatomia e da histologia do rato de laboratório, publicado em 2019, descreveram:

O rato possui dentição única, com 16 dentes, sendo 4 incisivos e 12 molares. Os incisivos irrompem 10 dias após o nascimento, sendo seguidos pelos molares nos dias 19, 23 e 35, na sequência, de anterior para posterior. Incisivos continuam crescendo durante toda a vida do rato, continuamente desgastando um ao outro pelo ato de roer, mantendo, assim, a borda em formato cinzelado. Incisivos crescem a uma velocidade de 2,1 (superiores) e 2,8 (inferiores) milímetros por semana, e qualquer lesão a um incisivo resulta em um maior crescimento do dente antagonista. A coloração amarelo-alaranjada dos incisivos que aparece por volta da quinta semana após o nascimento ocorre devido a presença de pigmento contendo ferro. O órgão do esmalte dos dentes incisivos persiste no decorrer de toda a vida, mas o órgão do esmalte dos molares se degenera assim que o contato com o dente antagonista é estabelecido. A formação da dentina primária dos dentes molares é interrompida por volta de 125 dias após o nascimento, mas a produção de cemento continua por toda a vida. Cada dente molar tem várias raízes:

- Molares superiores - M1: 5 raízes; M2: 4 raízes, M3: 3 raízes;
- Molares inferiores - M1: 4 raízes; M2: 3 raízes, M3: 3 raízes.

Por fim, em 2010, Dammaschke et al (51), de modo muito claro e sucinto, caracterizou a dentição murina em sua pesquisa, revisão na qual foi avaliada a adequação dos dentes molares de ratos na avaliação pré-clínica de dispositivos médicos:

A dentição em ratos consiste em dois dentes incisivos e três dentes molares divididos por um diastema distinto em mandíbula e arco maxilar. Os incisivos são tipicamente moldados para roedores (em crescimento permanente, com um ápice bem aberto) e não podem ser comparados com dentes humanos. Por outro lado, os dentes molares de ratos, incluindo o tecido pulpar, podem ser considerados dentes molares humanos de tamanho reduzido, com características anatômicas, histológicas, biológicas e fisiológicas semelhantes. Seu desenvolvimento é análogo ao dos dentes molares humanos. Os dentes molares de rato exibem as mesmas características estruturais da câmara pulpar, tecido pulpar, raiz e delta apical com forame apical menores.

Os resultados desta revisão demonstram que a pesquisa realizada em dentes molares de ratos é transferível para seres humanos e outras espécies animais.

No homem, os molares superiores possuem três raízes e os inferiores, duas. De um modo mais detalhado, comparações entre molares humanos e de ratos foram fornecidos por Dammaschke no ano de 2010 (51).

Hoffman & Schour (52) foram os primeiros a documentar aspectos importantes da anatomia dos dentes de ratos. Relataram que altura da coroa anatômica do primeiro molar mandibular diminui como resultado do atrito de 1,3 para 0,7 mm, sendo que o maior desgaste ocorre dentro dos primeiros 100 dias de vida pós-natal (53). O comprimento das raízes aumenta de 0,4 a 3,7 mm, com a maior parte desse alongamento resultante da aposição de cemento celular.

A junção cimento-esmalte (CEJ), localizada na crista óssea alveolar por volta do 35º dia de vida, continua a se mover em direção oclusal mais rapidamente do que o osso depositado na crista alveolar, resultando em uma distância crescente de até 0,8 mm. A distância entre os ápices radiculares e o osso no qual as raízes estão inseridas aumenta com a idade, refletindo um desvio oclusal do dente. À medida que esse distanciamento ocorre, o osso é depositado no fundo do alvéolo (49).

A erupção de molares de ratos, acompanhada por desgaste oclusal rápido e aposição de tecido duro, continua ao longo da vida. A taxa de erupção, pelo menos em animais jovens, é mais rápida do que o aumento concomitante da altura óssea. Durante o período de 21 a 35 dias, o primeiro molar mandibular irrompe a uma taxa de 590µm/semana e sua raiz se alonga a uma taxa de 540µm/semana. A aposição óssea alveolar no fundo ocorre a uma taxa de 54µm/semana e na crista alveolar, a 160µm/semana (52).

Os molares murinos são bem menos volumosos que os incisivos e apresentam 5 a 6 raízes cuja formação se completa, aproximadamente, aos 70 dias. Os incisivos são monorradiculados e apresentam rizogênese contínua durante toda a vida para compensar o constante desgaste promovido pela sua função de roer; sua raiz é longa e curva para trás e o ápice fica localizado logo abaixo da região periapical dos primeiro e segundo molares (19).

A figura 1 ilustra a cronologia da odontogênese e rizogênese murinas. Já as figuras 2, 3 e 4 apresentam relação entre maxila e mandíbula murinas e as estruturas dos dentes incisivos e molares murinos.

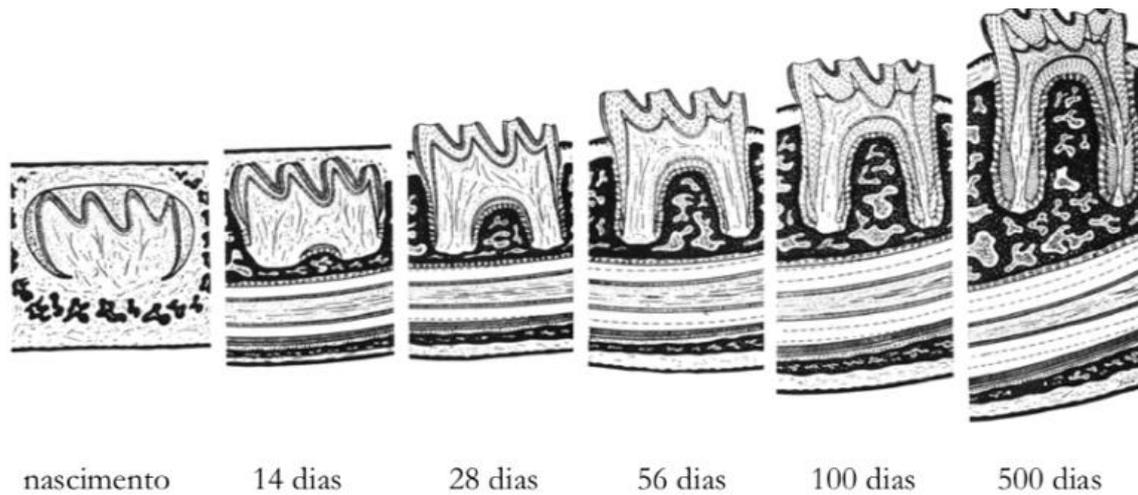
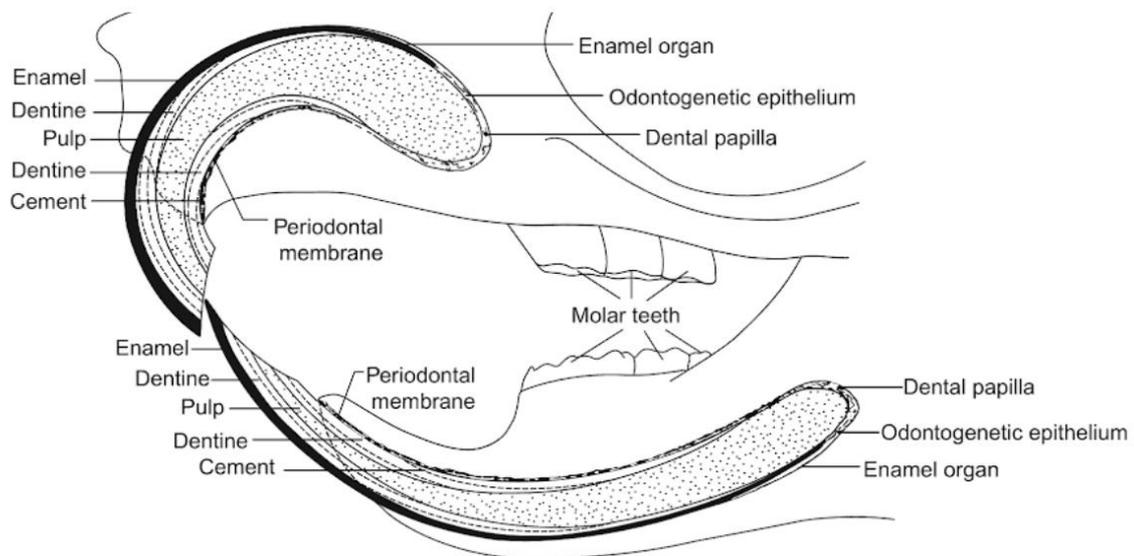


Figura 1 – Cronologia da odontogênese e rizogênese murina (19)



Note. Direction of lines of growth in the dentine

Figura 2 – Ilustração da relação entre maxila e mandíbula murinas e estrutura dos dentes incisivos superiores e inferiores (50)

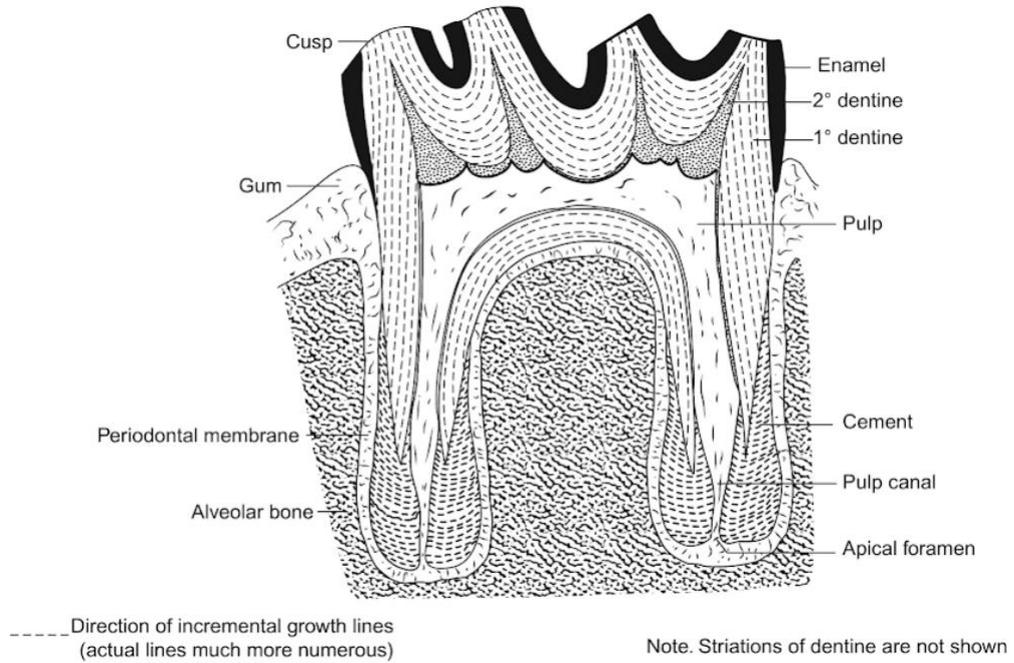


Figura 3 – Estrutura de um dente molar murino (50)



Figura 4 – Aspectos anatômicos dos dentes murinos no contexto do crânio (A) e em corte longitudinal (B) para demonstrar suas relações com o tecido ósseo alveolar e com os incisivos (19)

1.5 OBJETIVOS

O presente estudo tem o objetivo de observar, de forma descritiva, os aspectos morfológicos radiculares de dentes molares de ratos Wistar submetidos a tratamento com bisfosfonato injetável (ácido zoledrônico) e tratados com ozonioterapia através de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O advento dos BFs como medicamentos utilizados para prevenção e tratamento de doenças ósseas promoveu uma série de publicações, incluindo-se revisões extensas e minuciosas. Vários estudos de interesse odontológico foram realizados, observando a influência dessas drogas no desenvolvimento dentário. Nesta revisão da literatura, enfatizam-se as investigações sobre a influência dos BFs na formação e nas alterações das estruturas dentárias, em especial do cimento radicular e demais estruturas adjacentes.

Alatli-Kut et al (54), em 1994, tinham o objetivo de examinar, por microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura, os efeitos de uma única injeção de 1-hidroxi-etilideno-1,1-bisfosfonato (HEBP) sobre o desenvolvimento da raiz de molares de ratos. Nesse experimento, 40 ratos Sprague-Dawley de 15 dias de idade e, aproximadamente, 30g, foram divididos em 4 grupos. Dois grupos receberam uma única injeção subcutânea na dosagem de 0,1ml/10g de peso corporal de uma solução aquosa de HEBP. Os outros dois grupos de animais serviram como controles e foram injetados com um volume igual de solução salina fisiológica. No final dos períodos de observação pré-definidos de 1, 2, 4, 10 e 15 dias, dois ratos de cada grupo foram mortos por decapitação e as estruturas, preparadas para análises em microscopia. Os resultados mostraram que a inibição da mineralização da dentina, bem como a falha na formação do cimento acelular, podem ser induzidas por uma única injeção de HEBP. Esse distúrbio na formação do cimento acelular pareceu estar relacionado às perturbações de mineralização da dentina radicular subjacente. A mineralização da dentina radicular foi reestabelecida 10 dias após a injeção da HEBP. Por outro lado, a formação de cimento não foi restabelecida após a recuperação da mineralização inicial da dentina, sendo permanente. Além disso, 4 dias após a injeção de HEBP, a superfície radicular mostrou formação de um cimento hiperplásico, semelhante ao cimento celular de fibras mistas, com um acúmulo mineral em sua superfície. Esse cimento hiperplásico atípico continha fibras de colágeno extrínsecas que desempenhavam um papel na ancoragem da raiz, porém, os dentes cobertos por ele foram muito mais facilmente extraídos do que os dentes controles. O mecanismo por trás do desenvolvimento do cimento hiperplásico atípico pode ser um efeito seletivo da HEBP em populações de células específicas que invadem o periodonto ou pode

ocorrer em resposta ao efeito inibitório da HEBP na mineralização da dentina do manto. As áreas de reabsorção observadas no cimento hiperplásico atípico sugerem que este cimento é menos resistente à reabsorção do que o cimento acelular de fibras extrínsecas normal.

No ano de 1996, para o estudo das alterações da superfície do cimento induzidas pelo 1-hidroxietilideno-1, 1-bisfosfonato (HEBP) nos primeiros molares maxilares de ratos, Alatli & Hammarstrom (55) utilizaram quatro grupos de ratos Sprague-Dawley. Dois grupos de ratos receberam uma única injeção de HEBP aos 12 dias de idade ou uma injeção de HEBP diariamente aos 10, 11 e 12 dias de idade. Os outros dois grupos serviram como controles e receberam uma única injeção de solução salina fisiológica aos 12 dias de idade ou uma injeção diária aos 10, 11 e 12 dias de idade. Para cada injeção, foi utilizado o volume de 0,1 ml/g de peso corporal. Dois ratos de cada grupo foram sacrificados após cada período de observação. Os primeiros molares superiores de ambos os grupos, experimental e controle, foram preparados para leitura em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Injeções simples ou triplas de HEBP inibiram a formação de cimento acelular de fibras extrínsecas e retardaram a formação de cimento celular de fibras mistas. Além disso, os resultados indicam a importância do cimento acelular de fibras extrínseca como barreira de proteção contra a reabsorção radicular e os diferentes mecanismos subjacentes à formação das duas variedades de cimento. Os presentes resultados mostram que o MEV é uma ferramenta valiosa no estudo dos detalhes da organização topográfica do cimento normal e induzido por BF.

No estudo de Hiraga et al (13), publicado no ano de 2010, ácido zoledrônico foi injetado em ratos de 7 e 14 dias de idade buscando determinar os efeitos desse BF na formação dentária. A análise radiográfica dos dentes inferiores demonstrou que o ácido zoledrônico inibia a erupção dos incisivos e molares e afetava sua formação, principalmente das raízes molares. O exame histológico mostrou que, em animais tratados com ácido zoledrônico, o osso alveolar permaneceu sem reabsorção ao redor das coroas dos dentes, o que prejudicou os ameloblastos e a matriz do esmalte, levando a defeitos do esmalte. Além disso, a proliferação aleatória de epitélio odontogênico e mesênquima associados a estruturas dentárias primitivas, que se assemelham a odontomas humanos, foi induzida na extremidade basal dos incisivos, mas não ao redor dos molares. A anquilose dentária no osso alveolar foi ocasionalmente observada em molares. Esses resultados sugerem que a

administração de BFs durante o desenvolvimento dentário tem o potencial de inibir a erupção e formação dos dentes e induzir vários tipos de anormalidades dentárias, que podem ser atribuídas às atividades osteoclásticas alteradas.

Nelson-Filho et al (56), no ano de 2012, avaliaram o efeito do uso sistêmico do alendronato sódico em ratos. Para isso, 45 ratos Wistar, com idade entre 36 e 42 dias, pesando entre 200 e 230g, foram aleatoriamente distribuídos em um grupo controle (n=20), que recebeu água destilada, e um grupo experimental (n=25), que recebeu duas doses semanais de 1mg/kg de alendronato de sódio quimicamente puro. Os animais foram mortos após 60 dias de tratamento. As tíbias foram removidas para análise da densidade mineral óssea por densitometria radiológica de dupla energia (DXA). Em seguida, os incisivos superiores foram extraídos para análise dos tecidos dentários mineralizados utilizando espectroscopia de fluorescência (FS), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de campo claro (BFM) e teste de microdureza de secção transversal (CSMH). O grupo experimental apresentou maior densidade mineral óssea do que o grupo controle pela DXA. A análise da FS revelou a presença de alendronato nos tecidos dentais mineralizados dos espécimes do grupo experimental. Diferenças morfológicas significativas não foram encontradas por MEV e BFM. O esmalte e a dentina (pontos a 100 e 300µm de distância da junção dentino-esmalte) não apresentaram diferença significativa entre os grupos controle e experimental. Com base nos resultados obtidos, foi concluído que, apesar de que o alendronato aumentou a densidade mineral óssea e foi incorporado nos tecidos dentários mineralizados, não causou alterações significativas na morfologia e na microdureza do esmalte e da dentina de incisivos de ratos.

Tendo em vista que a maioria dos estudos sobre os efeitos dos BFs nos dentes foi realizada in vitro ou em modelos animais, Moraes et al (10), no ano de 2014, tentaram descrever as alterações apresentadas por dentes humanos extraídos de áreas acometidas por MRONJ utilizando um desenho de estudo retrospectivo. Para isso, 16 dentes de 13 pacientes foram extraídos de áreas de MRONJ, descalcificados e embebidos em parafina. Uma série de cortes de 5 µm foram preparados, corados com hematoxilina e eosina e observados ao microscópio de luz. A maioria dos pacientes era do sexo feminino (53,85%), com média de idade de 60,23 ± 13,18 anos. O zoledronato intravenoso foi o BF mais comumente utilizado (92,3%), com um período médio de 2 anos. A alteração mais comum foi a hiper cementose (formação de cimento atípico - 87,5%), seguida de necrose pulpar (81,25%), calcificações

pulpaes aderidas à dentina e calcificações soltas na câmara pulpar e nos canais radiculares, além de calcificações lineares (68,75%), formação de material dentinóide/osteóide (18,75%), anquilose dentária (6,25%) e um caso com obliteração total da câmara pulpar. O achado de cálculos pulpaes, provavelmente originados da dentina, pode indicar atividade de BFs nos odontoblastos. Não foi possível observar diferenças nas alterações dentárias relacionadas ao tipo de BF utilizado, pois apenas um paciente havia sido tratado com alendronato. Em relação ao tempo de uso dos BFs, alterações dentárias foram detectadas em pacientes que foram tratados por, pelo menos, 1 ano. Assim, concluiu-se que os pacientes submetidos à terapia com BFs podem apresentar diversas alterações dentárias, que devem ser acompanhadas de perto pelos clínicos para prevenir complicações.

Rothbarth et al (57), no ano de 2014, investigaram os efeitos do alendronato sobre os tecidos dentário e periodontal após a luxação lateral dos molares em desenvolvimento. Para isso, 54 ratos Wistar com 21 dias de idade tiveram seus segundos molares superiores direitos luxados lateralmente. Os segundos molares esquerdos não foram luxados, sendo posteriormente usados como comparação. Adicionalmente, injeções diárias de $2,5\text{mg/kg}^{-1}$ de alendronato começaram no dia da luxação nos 27 animais do grupo de tratamento; os 27 animais do grupo controle receberam solução salina estéril. Os dentes foram analisados 7, 14 e 21 dias após o procedimento. Os maxilares foram fixados, descalcificados e embebidos em parafina ou resina de Spurr. As secções de parafina foram coradas com eosina e hematoxilina, incubadas para histoquímica TRAP ou imunomarcadas para osteopontina. Secções ultrafinas de Spurr foram examinadas em microscópio electrónico de transmissão. Após 21 dias, os ápices radiculares dos molares sem alendronato luxados estavam abertos, desorganizados e cobertos por uma camada irregular de cemento celular, o que não foi observado nos animais tratados com alendronato. Locais de anquilose foram observados em ratos tratados com alendronato em dentes luxados e não luxados. Os osteoclastos positivos para TRAP foram mais numerosos no grupo tratado com alendronato, apesar de sua aparência ultraestrutural latente sem a presença de aparato de reabsorção, em comparação com os controles. A imunomarcagem de osteopontina revelou uma linha imunopositiva espessa na dentina que deve ser resultante do momento da luxação, enquanto que as amostras tratadas com alendronato não apresentaram alterações na dentina. Embora os BFs estejam frequentemente relacionados ao aumento do risco de complicações, como a MRONJ,

os resultados demonstraram que o tratamento com alendronato é capaz de atenuar as graves alterações na formação de dentina e cimento observadas em dentes luxados com raízes incompletas.

Em 2015, Yoo et al (58) avaliaram se o zoledronato poderia suprimir a progressão da reabsorção radicular externa devido ao reimplante tardio em ratos através da inibição da atividade osteoclástica. Nesse estudo, foi estimada a dose ideal de zoledronato no tratamento endodôntico em modelo animal para um efeito máximo desse medicamento, avaliando, ainda, seu efeito a longo prazo. Para isso, os primeiros molares maxilares de ratos Sprague Dawley (n=84) foram extraídos, secos por 60 minutos e, então, reimplantados. Os ratos foram divididos em 6 grupos: 1 mM de alendronato e 1, 5, 10, 20, 40 μ M de zoledronato. Quatro e oito semanas após a implantação, os animais foram sacrificados e avaliados por meio de análise radiográfica e histológica. Não houve diferenças significativas em 4 semanas. No entanto, em 8 semanas, os grupos tratados com 10, 20 e 40 μ M de zoledronato apresentaram aumento da radiopacidade e menores lesões periapicais em análise radiográfica. Na análise histológica, todos os grupos mostraram taxa de reabsorção radicular inflamatória similar em 4 semanas. Entretanto, em 8 semanas, 20 e 40 μ M de zoledronato apresentaram taxas menores que as de outros grupos ($p < 0,05$). A principal preocupação do reimplante dentário tardio é a prevenção da reabsorção radicular por substituição e a redução da inflamação, economizando tempo para o tecido conjuntivo adjacente à raiz preencher e reparar o espaço do ligamento periodontal. Em relação à reabsorção por substituição, não houve diferenças estatisticamente significativas. Entretanto, o zoledronato foi capaz de limitar a ocorrência de reabsorção radicular no modelo de reimplante tardio. Em particular, a dose de 20 μ M de solução de zoledronato mostrou-se a mais eficaz no acompanhamento a longo prazo e pode ser adequada para a inibição da reabsorção radicular no reimplante dentário tardio.

No ano de 2016, com o objetivo de avaliar os efeitos do uso sistêmico de alendronato de sódio sobre a resistência do esmalte e a permeabilidade de dentes de ratos submetidos a desafios ácidos, Nelson-Filho et al (59) utilizaram 36 dentes de 18 ratos Wistar, com idades entre 36 e 42 dias (200 a 230g). Esses dentes foram divididos em um grupo alendronato (n=20), que recebeu duas doses semanais de 1mg/kg de alendronato, e um grupo não-alendronato (n=16), que recebeu apenas água destilada.

Após 60 dias, os animais foram mortos. Os incisivos superiores foram extraídos e utilizados para a indução artificial de lesão de cárie (regime de ciclagem de pH) e de área de erosão (ciclos de imersão em refrigerante tipo cola) e para o teste de permeabilidade do esmalte (penetração do corante). Os dentes foram subdivididos em grupo alendronato (n=10) ou grupo não-alendronato (n=8) para cada teste. As variáveis de resposta quantitativa foram a variação longitudinal percentual na microdureza Knoop (%LMC), a área de lesão de cárie/erosão do esmalte (CELA) e a permeabilidade do esmalte. Os grupos não foram significativamente diferentes ($p>0,05$) em relação à microdureza Knoop e à permeabilidade do esmalte. Para o CELA, não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) entre o grupo não-alendronato e o grupo alendronato. Com base nos resultados apresentados, o alendronato de sódio não afetou a microdureza longitudinal, a área de lesão por desmineralização ou a permeabilidade do esmalte após desafio ácido e, portanto, o alendronato não transformou o esmalte de ratos em um tipo mais resistente aos desafios ácidos.

Com o objetivo de avaliar os efeitos do alendronato em osteoblastos primários humanos, em 2016, Krüger et al (1) incubaram osteoblastos juntamente com diferentes concentrações da medicação (5, 20 e 100IM), colhendo-as após 1, 3, 7 ou 14 dias. A proliferação foi avaliada por incorporação de 3H-timidina e por ensaio colorimétrico tetrazólio (MTT). A viabilidade foi avaliada pela atividade da lactato desidrogenase (LDH) no meio. A diferenciação foi avaliada usando ensaios multiplex de proteína Luminex e por RT-PCR. O alendronato não teve efeitos significativos na viabilidade celular. As concentrações mais baixas aumentaram a proliferação, enquanto 100IM diminuíram a proliferação. Além disso, o alendronato aumentou a secreção de fatores imunológicos de osteoblastos humanos, o qual, combinado com uma menor taxa de proliferação e um declínio na diferenciação, pode causar alterações locais indesejáveis no osso.

Najeeb et al (60), em sua revisão sistemática publicada em 2017, analisaram e resumiram a literatura sobre o uso de BFs na prevenção da reabsorção radicular de dentes avulsionados. Os autores apresentaram vários estudos em animais, os quais sugeriam efeitos anti-reabsortivos dos BFs quando aplicados em casos de avulsões dentárias. No entanto, outros estudos relataram resultados piores ou nulos no tratamento de dentes avulsionados. Observou-se que os BFs, quando revestidos em implantes dentários, diminuem a perda óssea marginal e aumentam o contato osso-

implante. Além disso, a aplicação local de BFs resultou em melhora da cicatrização periodontal clínica quando usada como adjuvante da raspagem e alisamento radicular. Os BFs também foram combinados com esponjas de colágeno para a regeneração da crista alveolar pós-extração. Foi constatado que a aplicação superficial de BF pode inibir a reabsorção óssea ao impedir a proliferação e a atividade dos osteoclastos, desencadeando sua apoptose. Além disso, os BFs também podem estimular a produção de osteoblastos, levando à formação óssea aumentada. No entanto, o uso clínico de BFs na prática odontológica tem sido limitado devido aos seus efeitos colaterais. Embora o tratamento de superfície tenha apresentado resultados favoráveis, o uso intracanal resultou em desfechos ruins ou insignificantes. Portanto, mais estudos são necessários para averiguar a eficácia dos BFs antes que eles sejam usados como medicamentos intracanal.

No ano de 2017, para testar a hipótese de que o tratamento com BFs intravenosos (IV) espessam ou alteram a micromorfologia do cemento e do ligamento periodontal em pacientes com câncer, Paglioni et al (61) extraíram trinta e dois dentes de 24 pacientes com câncer e separaram em grupos de teste (pacientes que foram submetidos a terapia com BFs IV, n=16) e controle (pacientes que nunca receberam terapia com BF, n=16). A espessura do cemento foi medida em 3 áreas diferentes da raiz dentária por microscopia de luz polarizada. O ligamento periodontal foi avaliado por microscopia ótica e pela expressão imuno-histoquímica da periostina. Nenhuma diferença significativa foi detectada na espessura do cemento entre os grupos. Adicionalmente, o número de fibroblastos no ligamento periodontal, as linhas incrementais de cemento e os padrões imuno-histoquímicos da expressão de periostina no ligamento periodontal não diferiram entre os grupos. Assim, concluiu-se que terapia com a BFs IV não aumenta a espessura do cemento nem altera a micromorfologia do ligamento periodontal.

Vermeer et al (62) investigaram, em 2017, se a exposição a BF in vivo gera diferentes efeitos nos osteoclastos de ossos longos e nos osteoclastos de maxilares, avaliando, ainda, a rotatividade desses diferentes ossos. Para isso, durante 6 meses, $0,5 \text{ mg/kg}^{-1}$ de ácido zoledrônico foi administrado semanalmente por via intraperitoneal a camundongos fêmeas com 3 meses de idade. Os efeitos no número de osteoclastos, mineralização óssea e formação óssea foram medidos nos ossos longos e na mandíbula. Foi constatado que tratamento prolongado com ácido zoledrônico reduziu o número de células da medula óssea da mandíbula, sem afetar o número de células

da medula de ossos longos. Além disso, o tratamento com ácido zoledrônico não afetou o número de osteoclastos in vivo. No entanto, o BF aumentou o volume ósseo e a densidade mineral do osso longo e da mandíbula. Curiosamente, 6 meses de tratamento suprimiram a formação óssea nos ossos longos, sem afetar a mandíbula. Inesperadamente, foi mostrado que os BFs podem causar reabsorção radicular em molares, mediada por osteoclastos ativos. Assim, os resultados demonstraram que os BFs podem estimular a atividade dos osteoclastos nas raízes molares.

3 METODOLOGIA

O presente ensaio laboratorial em modelo animal foi realizado concomitantemente com o estudo de Pires (29), aprovado pela Comissão de Ética de Uso Animal da Universidade de Brasília (CEUA-UnB), sob o Protocolo de número 34/2017 (Anexo A). Para avaliar a ação da ozonioterapia sistêmica em MRONJ induzida por BF, o autor extraiu os primeiros molares inferiores esquerdos dos murinos, os quais foram utilizados para a análise dos aspectos morfológicos radiculares dessas estruturas pelo presente estudo.

3.1 DESCRIÇÃO, OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Para composição da amostra, foram utilizadas 44 cobaias, *Rattus norvegicus albinus* (Wistar), machos, com aproximadamente 60 dias de vida e 240g de massa corpórea média, adquiridos no Biotério Central da Universidade Federal de Goiás e, durante o estudo, acomodados no Biotério de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. Os animais foram recebidos doze dias antes do início do experimento, período que foi usado para climatização da amostra.

No D0, os animais foram recebidos e distribuídos, de forma aleatória simples, em 4 grupos, cada um com 11 cobaias. Foram, então, armazenados em caixas de polipropileno com tampa zincada e forramento com serragem, com acesso à ração e água *ad libitum*, mantidos em ciclos sucessivos *claro/escuro* de 12h e em temperatura média de $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.2 DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS

Os 44 ratos foram distribuídos, de forma aleatória simples, em dois grupos com 22 animais cada: Grupo Z, o qual recebeu tratamento com bisfosfonato, e Grupo C, o grupo controle. Cada grupo foi, então, subdividido em dois subgrupos com 11 animais cada: Grupo OZ, o qual recebeu ozonioterapia, e Grupo ST, o qual não recebeu tratamento, conforme a tabela 1.

3.3 OZONIOTERAPIA

O presente projeto é ramificação de outro, o qual avaliou a ação de ozonioterapia sistêmica em osteonecrose induzida por bisfosfonato em modelo animal experimental (29). Nesse estudo, como fator traumático desencadeador da osteonecrose, foram extraídos o primeiro molar inferior esquerdo de todos os animais, dentes os quais foram usados na presente pesquisa para avaliação radicular.

Após o período de climatização no biotério, foi iniciada a ozonioterapia, avaliando sua possível ação através do condicionamento oxidativo. Dessa forma, a terapia foi administrada previamente ao surgimento da MRONJ e durante o provável desenvolvimento dessa condição.

No D12, os animais dos Grupos ZOZ e COZ passaram a receber mistura gasosa de oxigênio/ozônio (O₂/O₃), via insuflação retal, conforme metodologia utilizada por Fernández et al (63), na concentração de 20µg/ml e 5ml de volume, duas vezes por semana, durante nove semanas.

A administração do gás iniciou-se na semana anterior ao início da administração de bisfosfonato ou soro fisiológico, mantendo-se, assim, a aplicação de ambos de forma concomitante durante 8 semanas.

A mistura gasosa de O₂/O₃ foi obtida por meio de gerador de O₃ medicinal (Philozon, MedPlus/Registro na Anvisa: 80472910001), sendo produzida a partir de oxigênio medicinal (99,5% de pureza), com pressão de entrada estabilizada (Figura 5).

Por intermédio de seringa plástica Luer siliconizada, 5ml da mistura gasosa eram colhidos e administrados por insuflação retal. Para administração, foi utilizada cânula de aspiração de silicone e auxílio de gel lubrificante, inserindo-se aproximadamente 4cm material no reto do animal (Figura 6).

Tabela 1 - Distribuição dos grupos

	Bisfosfonato Z (22)	Controle C (22)
Ozonioterapia OZ (22)	ZOZ - 11 ratos	COZ - 11 ratos
Sem tratamento ST (22)	ZST - 11 ratos	CST - 11 ratos



Figura 5 – Gerador de O3 medicinal e cilindro de oxigênio medicinal



Figura 6 – Ozonioterapia por insuflação retal

3.4 TERAPIA COM BISFOSFONATO

Iniciando no D21, os animais dos Grupos ZOZ e ZST passaram a ser submetidos a terapia com bisfosfonato (ZOMETA® 4mg/100ml, Novartis), via injeção intraperitoneal, na dose de 66µg/kg de massa corpórea do animal, conforme metodologia utilizada por Vidal-Gutiérrez et al (30), uma vez por semana, por 8 semanas. Já os Grupos COZ e CST receberam injeção de soro fisiológico, via intraperitoneal, uma vez por semana, por 8 semanas, com dosagem que seguiu o mesmo cálculo aplicado ao bisfosfonato (Quadros 1 e 2).

3.5 EXODONTIAS

No D42, coincidindo com a quarta semana de terapia medicamentosa, foram extraídos os primeiros molares inferiores esquerdos de todos os animais. Esse protocolo foi adotado e adaptado de Zandi et al (64).

A sedação foi realizada com Quetamina 10%, dosagem de 75mg/kg de massa corpórea do animal, e a anestesia, com Xilazina 2%, dosagem de 10mg/kg de massa corpórea do animal, ambas aplicadas via intraperitoneal (Quadro 3).

Após os procedimentos de sedação e anestesia, a cobaia foi posicionada sob decúbito dorsal na mesa operatória, imobilizando seus membros superiores e inferiores com fita adesiva. Para manutenção transoperatória da abertura bucal, fios ortodônticos de aço foram adaptados nos incisivos superiores e inferiores, sendo tracionados em direções opostas e aderidos à mesa operatória com fita adesiva. Com

ajuda de um auxiliar, a língua foi afastada com fio de sutura de nylon 4-0, o qual resvalava de um lado ao outro da estrutura, permitindo, assim, seu tracionamento.

Dois operadores calibrados executaram as exodontias. Foi utilizada clorexidina 4% não alcóolica para antissepsia extra oral e, para antissepsia intraoral, clorexidina 0,12% não alcoólica. O dente foi luxado com movimentos méso-distal e oclusal, utilizando o instrumento Hollemback 3S ou cureta de Molt, e removido do alvéolo com pinça hemostática, seguido por inspeção visual do dente, do alvéolo e das demais estruturas adjacentes. Feita sutura simples do tecido mole com fio de sutura reabsorvível de Poligalactina 4-0. Eventos cirúrgicos como fratura dentária e outras dificuldades operatórias foram registrados. Não foi aplicado cegamento aos operadores.

Os dentes extraídos foram higienizados com gaze embebida em soro fisiológico para remoção dos excessos dos remanescentes orgânicos das superfícies dentárias. Em seguida, foram armazenados em microtubos eppendorf identificados para posterior análise.

Imediatamente após as extrações, foi administrada Dipirona Sódica 500mg na dosagem de 300mg/kg de massa corpórea do animal, via subdérmica, repetindo-se a dose 6h após o procedimento cirúrgico. A cobaia era, então, levada para repouso e mantida sob observação até o fim do efeito da sedação. Nos dois dias seguintes às exodontias, manteve-se a administração do analgésico, aplicando duas vezes ao dia, em cada cobaia, a mesma dosagem anteriormente descrita.

Os procedimentos para realizar as exodontias e medicações estão ilustrados na figura 7.

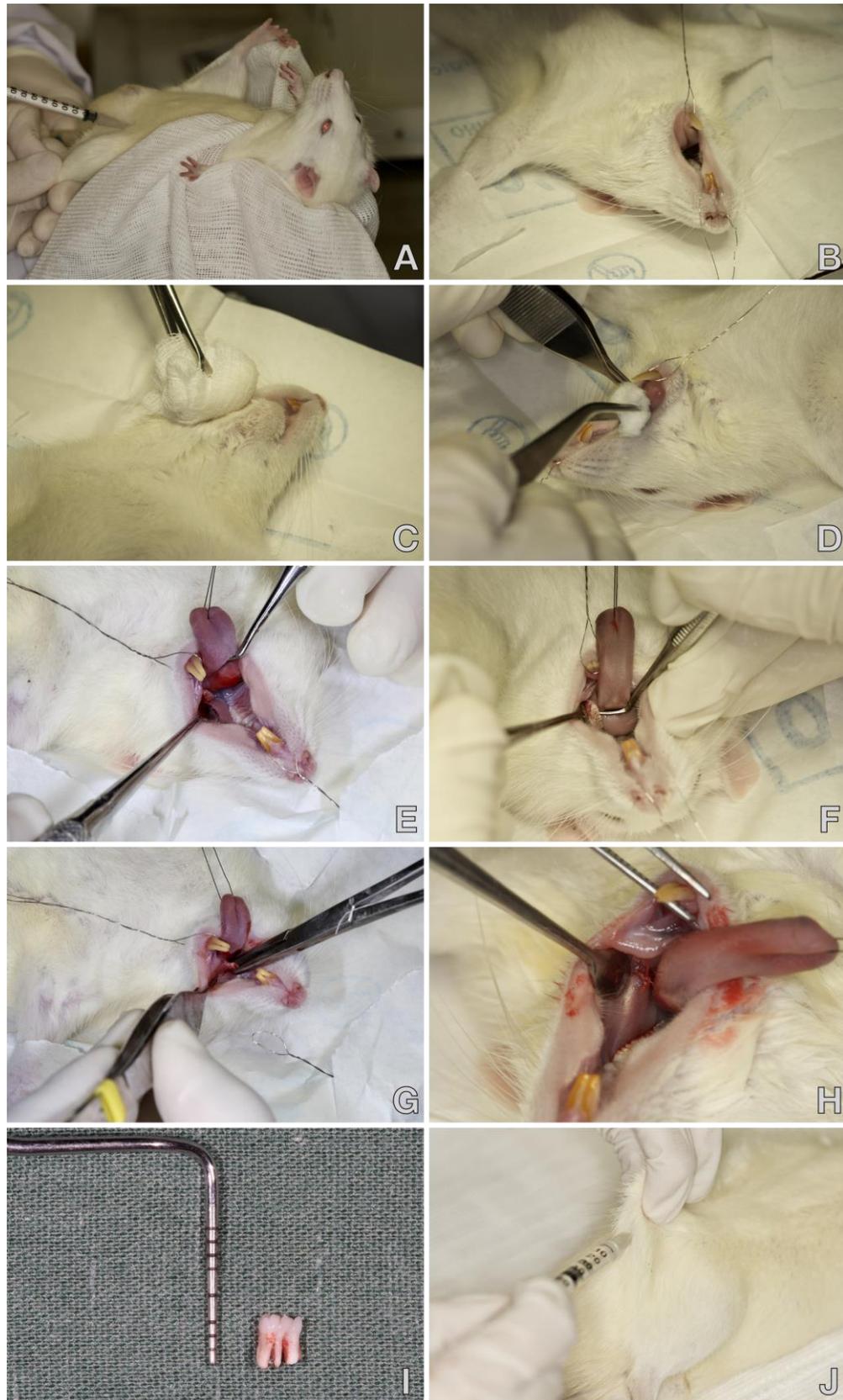


Figura 7 – Procedimentos para realização das exodontias e medicações. A: Anestesia; B: Fixação do animal a mesa operatória e manutenção da abertura bucal; C: Antissepsia extraoral; D: Antissepsia intraoral; E: Descolamento de tecidos moles; F: Luxação dentária; G: Remoção do dente do alvéolo; H: Sutura finalizada; I: Molar extraído; J: Administração do analgésico

3.6 EXAMES FÍSICOS E EUTANÁSIA

Exames físicos periódicos foram realizados nos animais, a fim de observar eventuais sinais clínicos de osteonecrose dos maxilares, como fístulas extra orais, sinais de perda de peso, alterações de comportamento e de estado geral, mudança da coloração de mucosas e perda de pelos.

Na 8ª semana após as exodontias, coincidindo com a 4ª semana após a última administração do BF, todos os animais foram submetidos à eutanásia por hipóxia em câmara de gás carbônico. Esse procedimento foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. As cabeças foram guilhotinadas e as mandíbulas, dissecadas, viabilizando a realização de outro estudo, o qual teve o objetivo de avaliar a ação da ozonioterapia sistêmica, por análise clínica e histopatológica, em ratos submetidos a indução de MRONJ (29).

3.7 PERDAS

O estudo teve a perda de 7 amostras. Cinco animais eram fêmeas, sendo 4 do grupo ZST e 1 do grupo CST, e foram excluídas na fase pré-operatória por risco de procriação, caso mantidas no mesmo ambiente dos machos. O sexto animal, pertencente ao grupo ZOZ, foi perdido por possível infecção do sistema auditivo e/ou neurológico, causando desorientação da cobaia. Além disso, um dente do grupo COZ fraturou durante a exodontia, de modo a não ser possível aproveitá-lo.

3.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Após as exodontias, os dentes foram levados ao Laboratório de Microscopia e Microanálise (LMM) do Instituto de Ciências Biológicas (IB) da Universidade de Brasília (UnB) para preparo e posterior leitura em microscopia eletrônica de varredura.

O número de dentes obtidos, de acordo com o grupo de origem, está descrito na tabela 2.

A grande maioria dos dentes extraídos continham fragmentos ósseos fortemente aderidos às superfícies radiculares, os quais não puderam ser removidos por risco de fratura da raiz associada. Dessa forma, optou-se por realizar a leitura da face (vestibular/lingual) com maior área de exposição radicular.

Tabela 2 – Número de dentes obtidos

	ZOZ	ZST	COZ	CST
N	10	7	9	10

Após completa secagem, cada dente foi posicionado em um suporte metálico (*stub*) com a face dentária eleita (vestibular/lingual) voltada para cima, sendo fixado ao suporte com fita de carbono dupla face. O processamento das amostras consistiu em metalização da superfície dentária utilizando um sistema de deposição de filme a alto vácuo (Leica, EM SCD 500), o qual recobriu a superfície exposta com 10nm de íons metálicos de ouro (Au).

O recobrimento metálico utilizado por esse procedimento visa tornar as amostras condutoras devido à necessidade de interação do feixe eletrônico com a amostra. As camadas depositadas podem melhorar o nível de emissão de elétrons, pois emitem mais elétrons que o material da amostra, facilitando a construção de imagens com boa resolução no microscópio. O sinal da imagem será resultado da interação do feixe incidente com a superfície da amostra. Entretanto, é preciso um controle da espessura depositada, a fim de evitar artefatos na imagem que possam mascarar a superfície real da amostra (65).

Aplicando-se a técnica dessa forma, apenas as estruturas mineralizadas são passíveis de observação em microscopia eletrônica de varredura.

Após a metalização, as amostras foram levadas para análise no microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM-7001F). Grupos de cerca de 5 a 6 *stubs* foram inseridos na câmara de amostras por vez. Após a obtenção do vácuo apropriado na câmara ($5,8 \text{ E}^{-4}$ Pascal), a superfície radicular de cada dente foi analisada em busca de possíveis alterações. Para todas as amostras, foram geradas imagens com os aumentos de 15, 85 e 200 vezes, possibilitando, respectivamente, visualização geral de coroa e raízes presentes, ampliação para análise da superfície radicular e maior ampliação para análise da mesma estrutura. Todas as análises foram realizadas pelo mesmo operador, sem cegamento. A figura 8 esquematiza a linha do tempo da pesquisa.

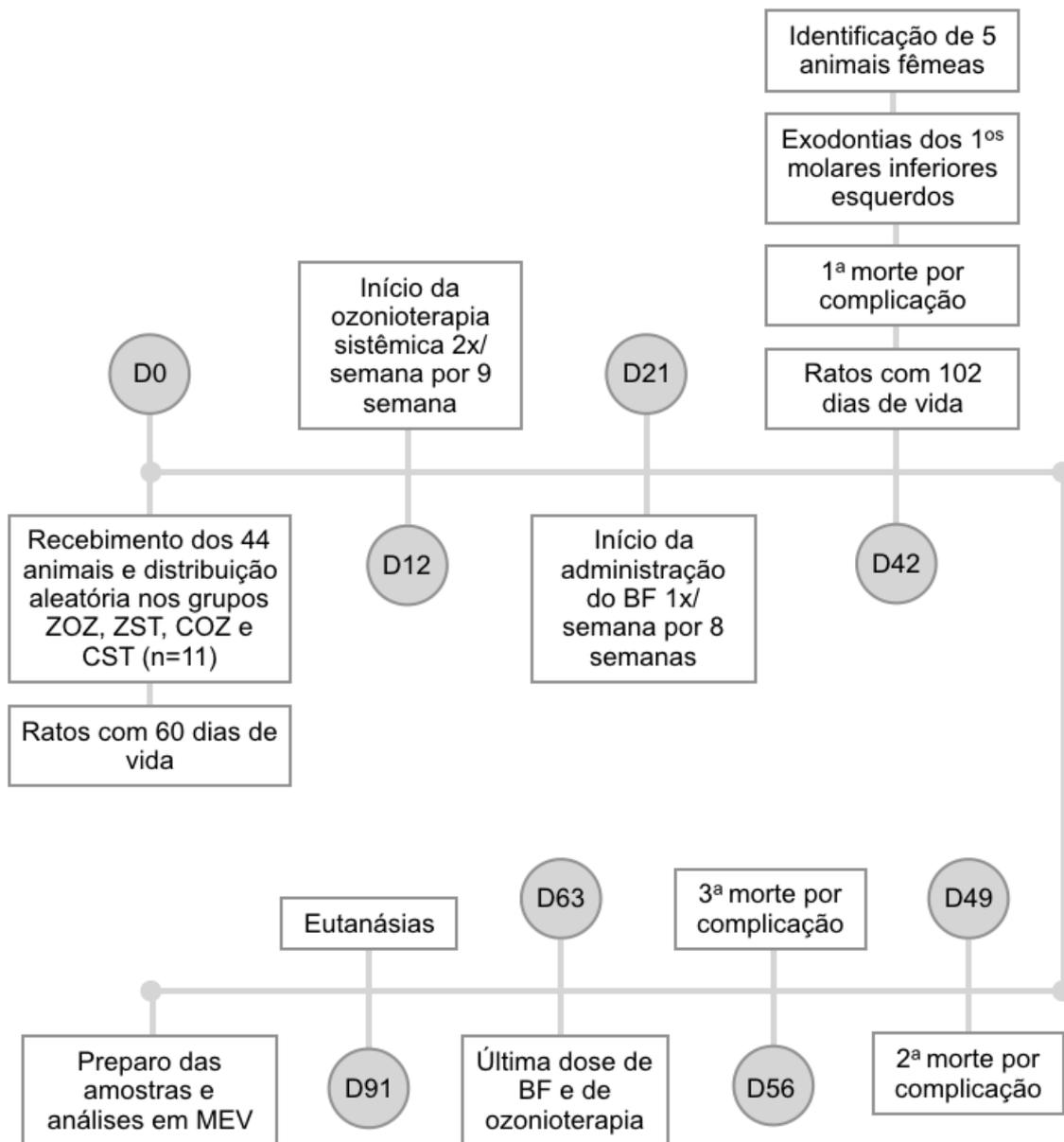


Figura 8 – Linha do tempo da pesquisa

4 RESULTADOS

Em geral, os animais do estudo toleraram bem o procedimento, mostrando hemostasia adequada e recuperação rápida após as exodontias. Nenhuma lesão associada foi observada após a anestesia, porém, duas mortes ocorreram por complicações pós-operatórias.

Os principais eventos adversos durante o procedimento cirúrgico foram as fraturas dentárias. Em todos os grupos ocorreram fraturas radiculares, ora com comprometimento apenas de extremidade apical, ora com envolvimento total de uma ou mais raízes. Adicionalmente, um dente do grupo COZ fraturou totalmente durante a exodontia, de modo a não ser possível aproveitá-lo. Além disso, ocorreram fraturas da lâmina alveolar, permanecendo essa, ou não, aderida ao dente, e dentes extraídos com osso interradicular, eventos que dificultaram a visualização e análise radicular no MEV. As figuras 9, 10, 11 e 12 apresentam uma visão corono-radicular dos primeiros molares inferiores esquerdos obtidos dos grupos ZOZ, ZST, COZ e CST, respectivamente.

O cimento presente nas porções mais próximas do ápice radicular de todos os grupos apresentou uma estrutura mais rugosa e volumosa, quando comparado ao cimento que recobre as regiões média e cervical (corpo) radiculares. As figuras 13, 14, 15 e 16 apresentam as porções mais próximas do ápice radicular dos grupos ZOZ, ZST, COZ e CST, respectivamente. Do mesmo modo, as figuras 17, 18, 19 e 20 apresentam as regiões de corpo radiculares dos grupos ZOZ, ZST, COZ e CST, respectivamente. Para a composição das imagens, foram eleitos um ápice e um corpo radicular de cada dente, tendo como critérios de eleição a maior preservação estrutural e melhor visibilidade.

Durante a análise, foram identificadas reabsorções rasas na superfície do cimento nos grupos ZST, COZ e CST, ocorrendo, predominantemente, no terço cervical radicular, próximo à junção cimento-esmalte (Figura 21).

As imagens em MEV demonstraram, ainda, regiões craqueladas nas superfícies radiculares de todos os grupos, predominantemente em áreas de furca e corpo radicular. Essas alterações estavam presentes em diferentes comprimentos e profundidades. As figuras 22, 23 e 24 apresentam os craquelamentos dos grupos

tratados com bisfosfonatos (ZOZ e ZST), controle com ozonioterapia (COZ) e controle puro (CST), respectivamente.

Maiores detalhes da topografia radicular dos primeiros molares inferiores esquerdos extraídos das cobaias dos grupos ZOZ, ZST, COZ e CST, em diferentes aumentos e de variadas regiões podem ser visualizados nas figuras 25, 26, 27 e 28, respectivamente, presentes nos anexos.

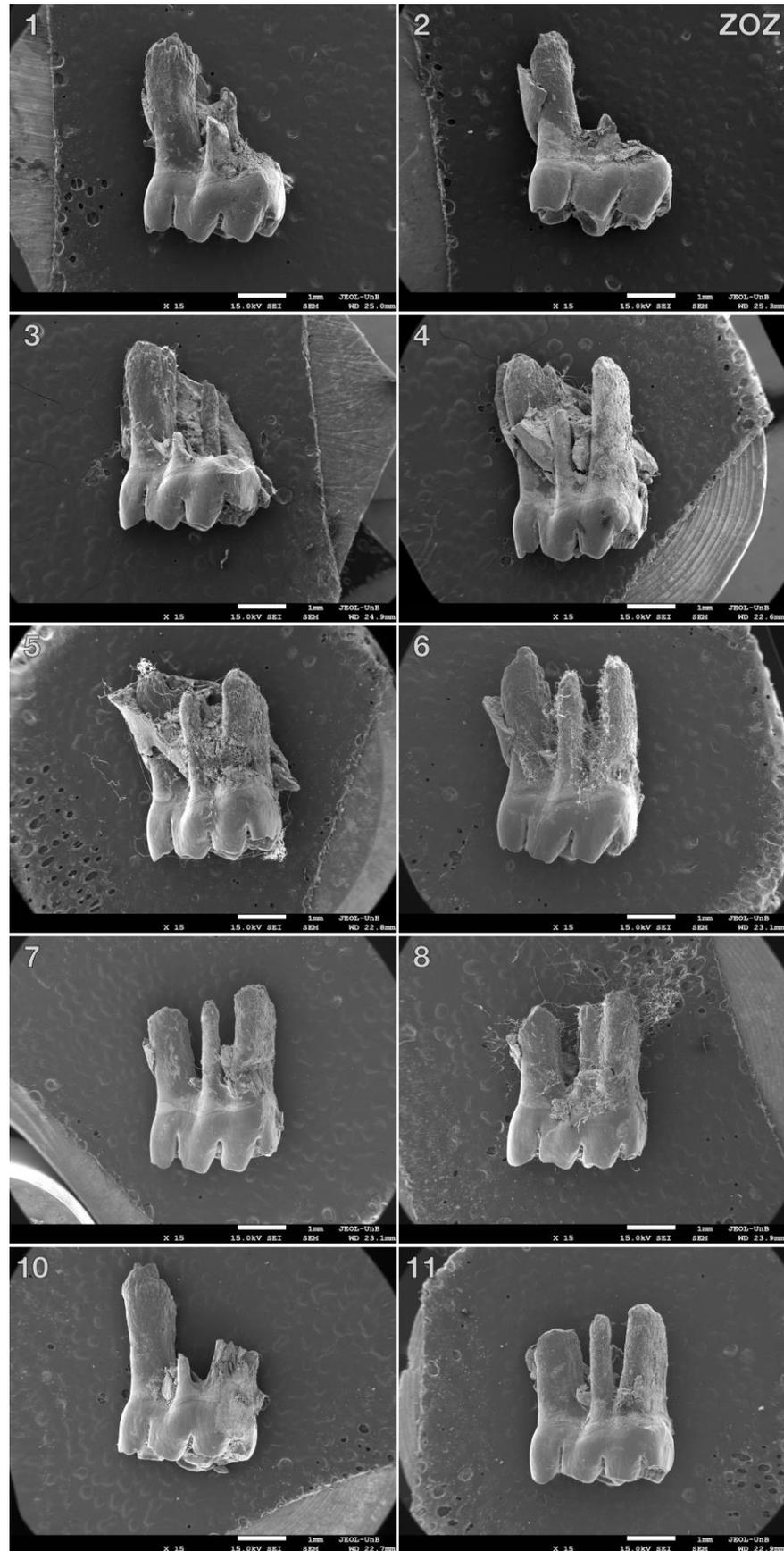


Figura 9 – Visão corono-radicular em MEV dos primeiros molares inferiores esquerdos extraídos do grupo ZOZ. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Aumento: 15X

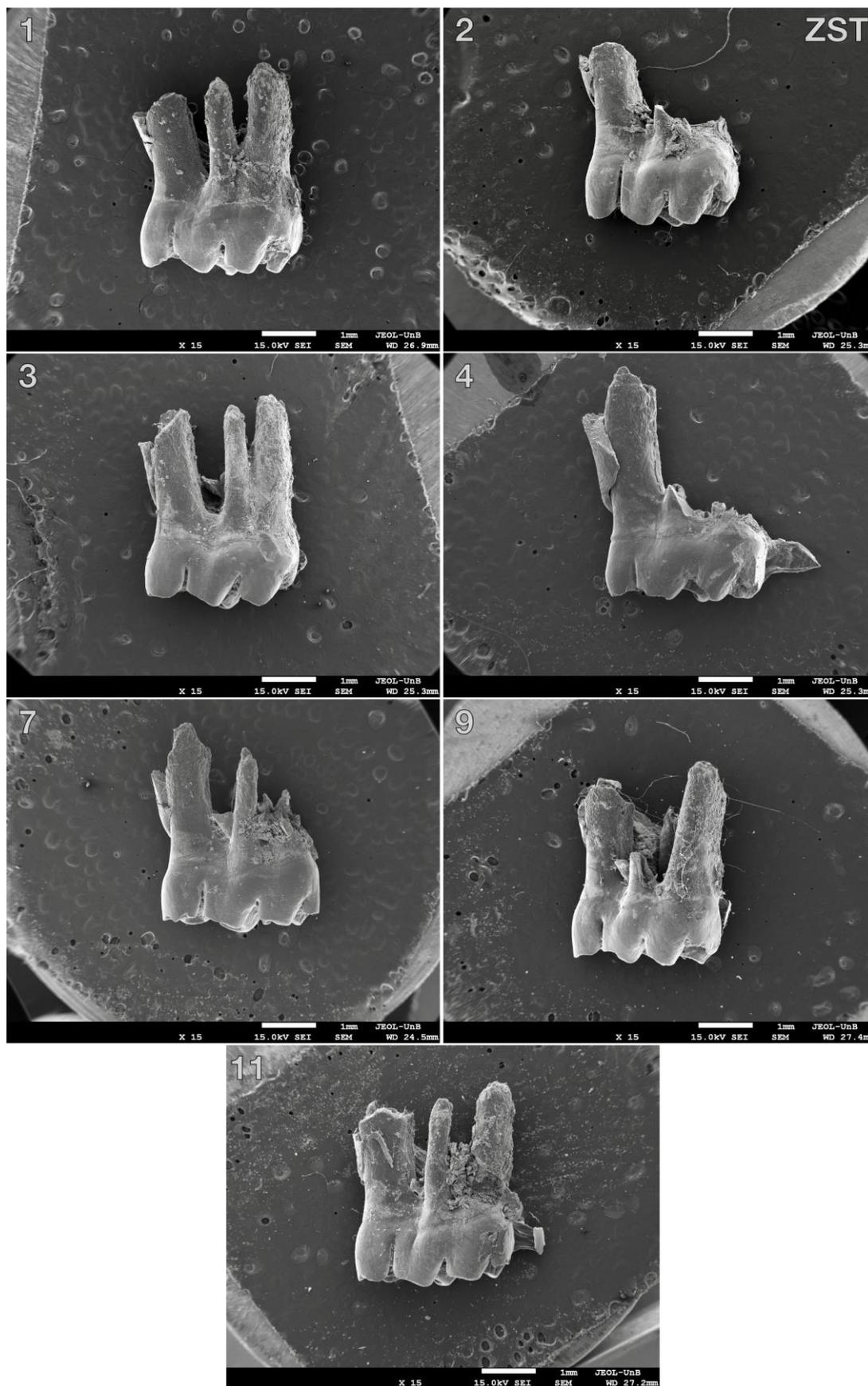


Figura 10 – Visão corono-radicular em MEV dos primeiros molares inferiores esquerdos extraídos do grupo ZST. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Aumento: 15X

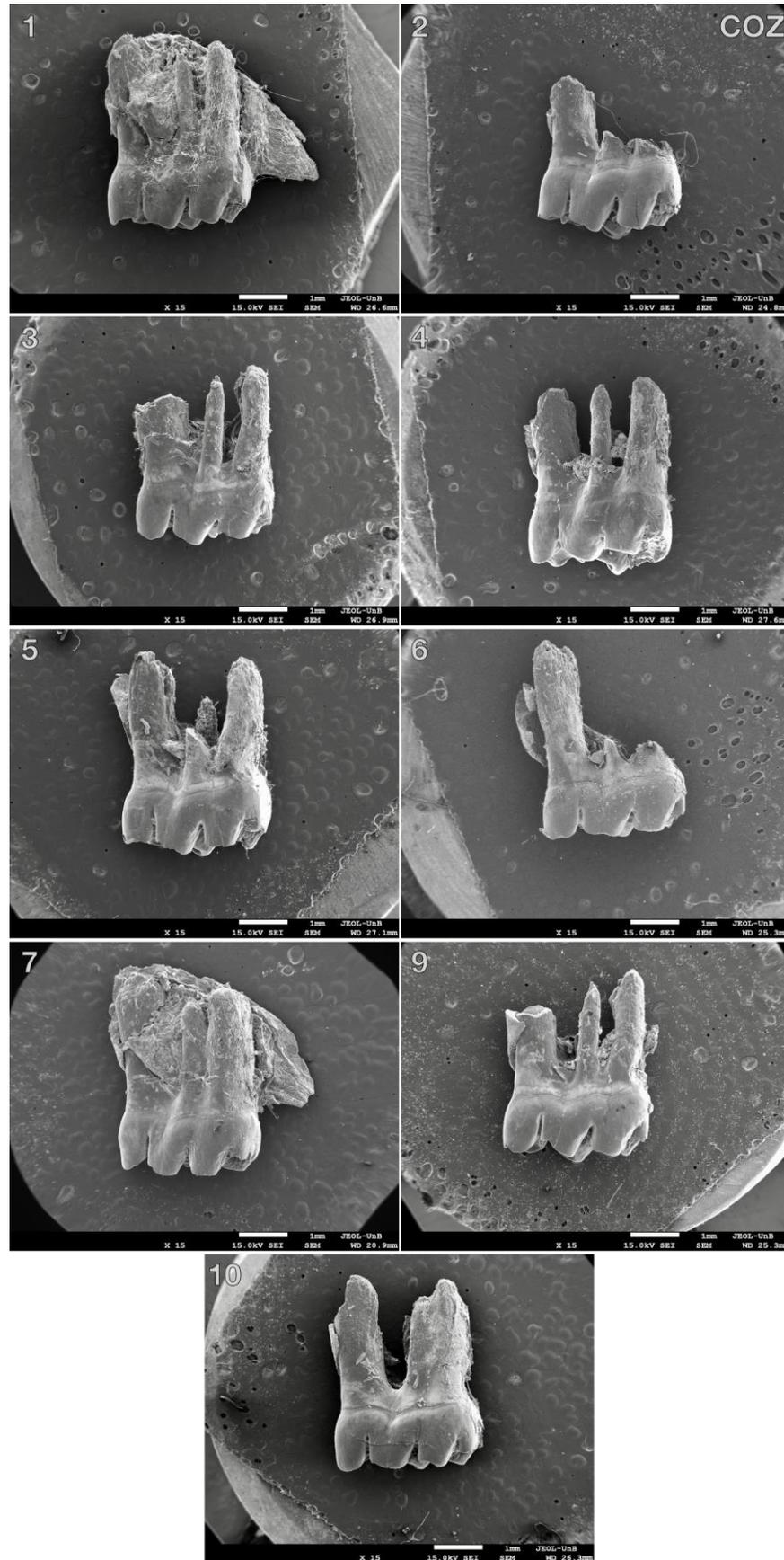


Figura 11 – Visão corono-radicular em MEV dos primeiros molares inferiores esquerdos extraídos do grupo COZ. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Aumento: 15X

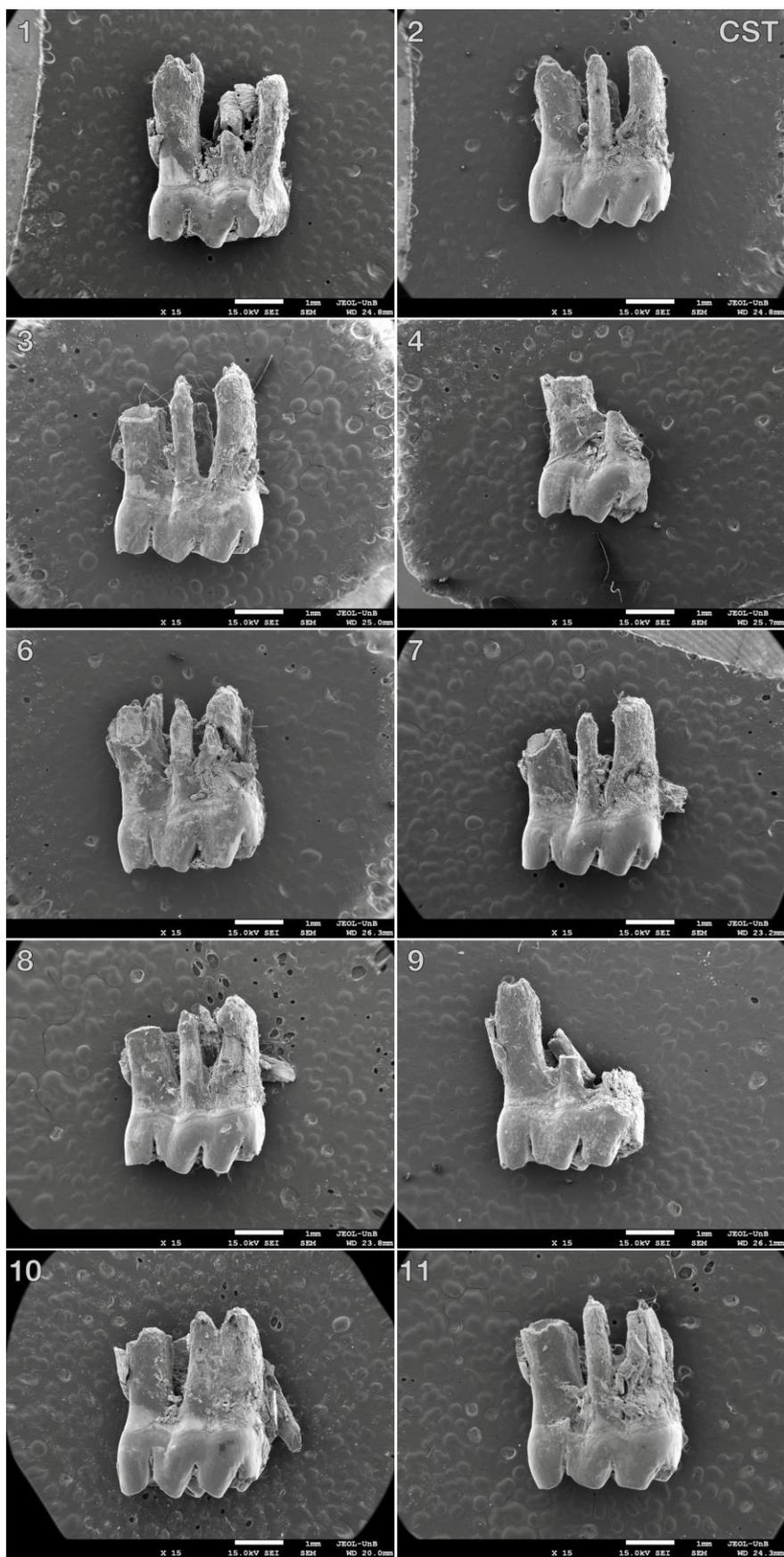


Figura 12 – Visão corono-radicular em MEV dos primeiros molares inferiores esquerdos extraídos do grupo CST. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Aumento: 15X

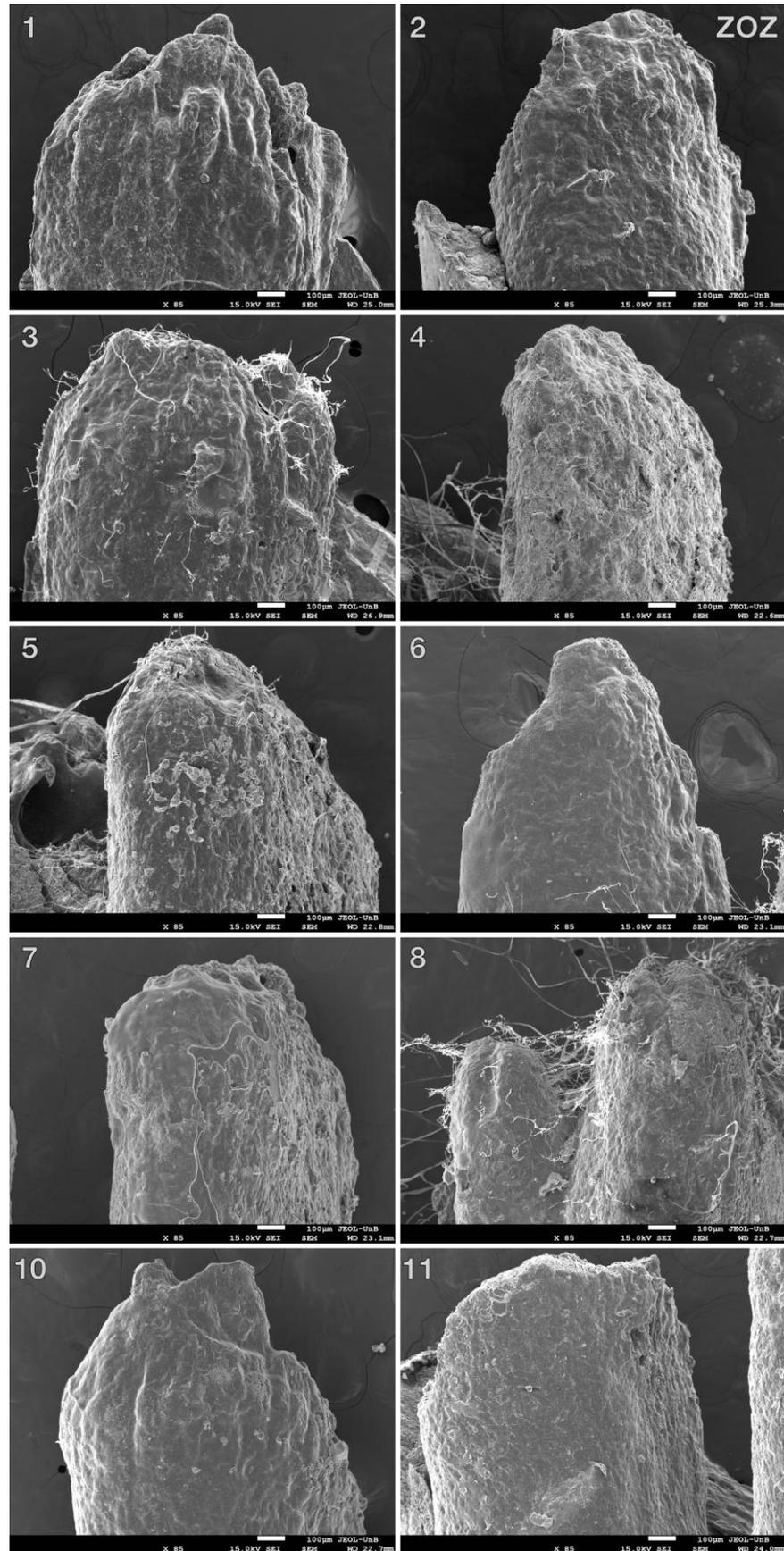


Figura 13 – Ápices radiculares dos primeiros molares inferiores esquerdos extraídos do grupo ZOZ. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Aumento: 85X

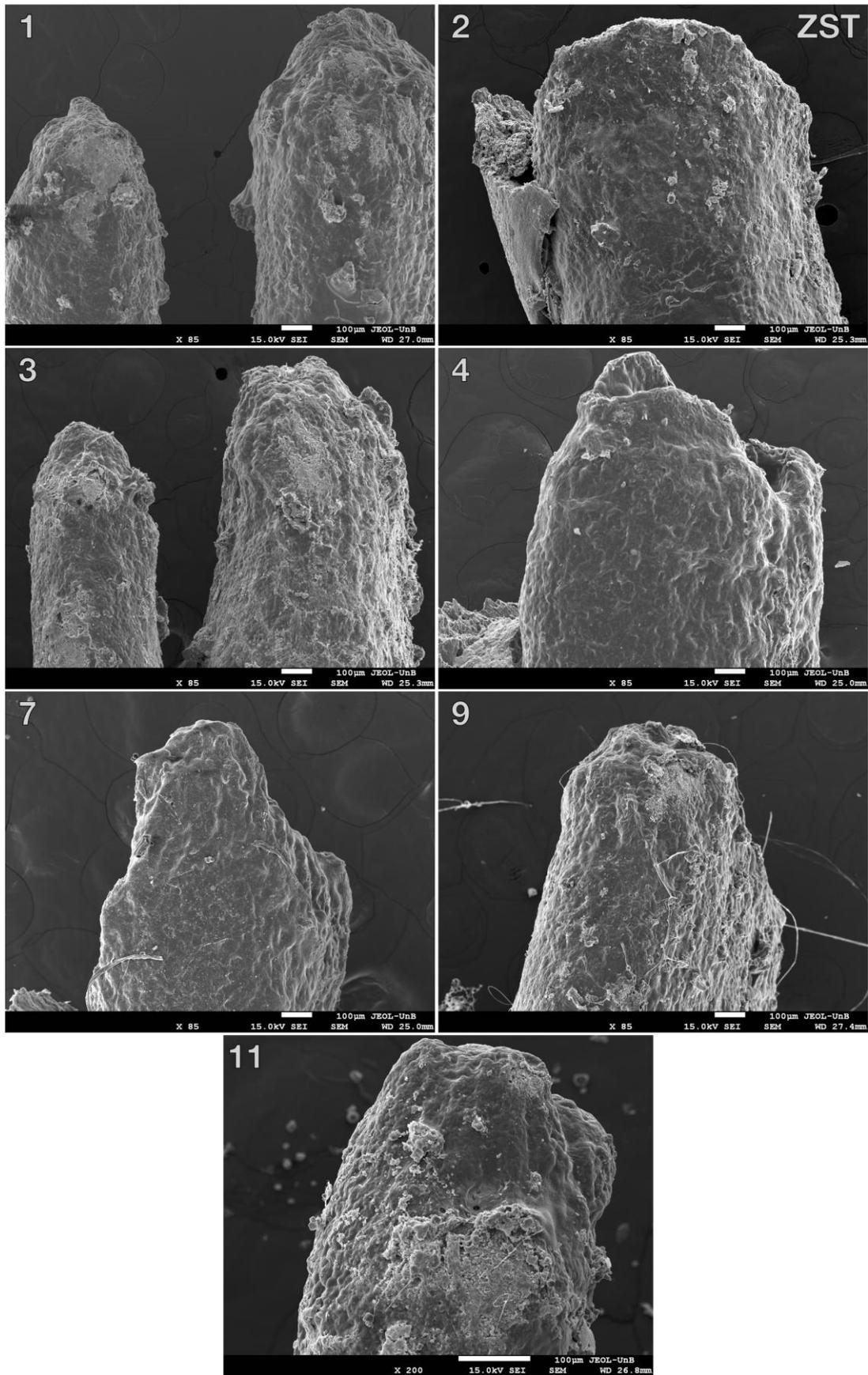


Figura 14 – Ápices radiculares dos primeiros molares inferiores esquerdos extraídos do grupo ZST. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Aumentos: 1-9=85X; 11=200X

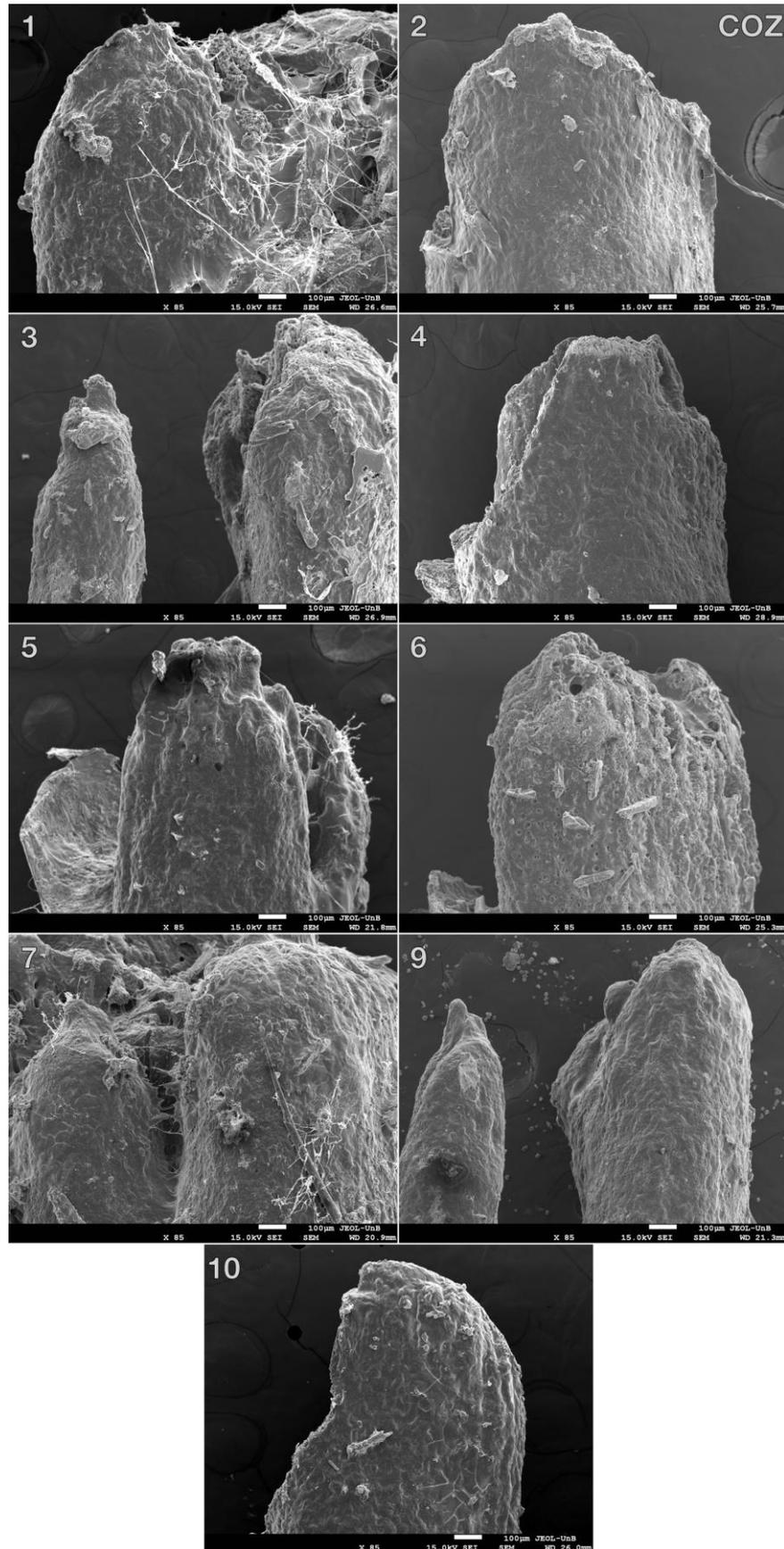


Figura 15 – Ápices radiculares dos primeiros molares inferiores esquerdos extraídos do grupo COZ. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Aumento: 85X

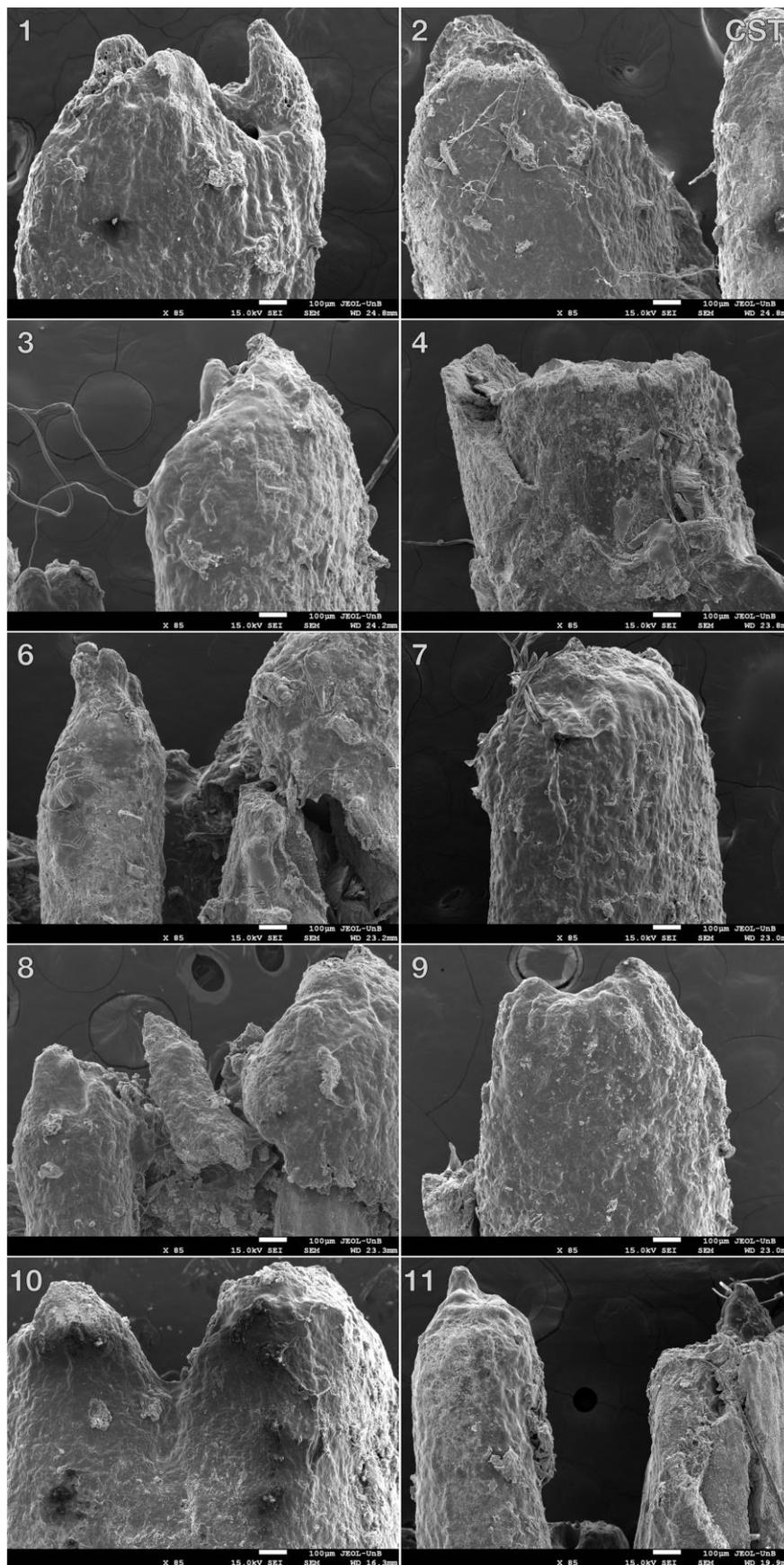


Figura 16 – Ápices radiculares dos primeiros molares inferiores esquerdos extraídos do grupo CST. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Aumento: 85X

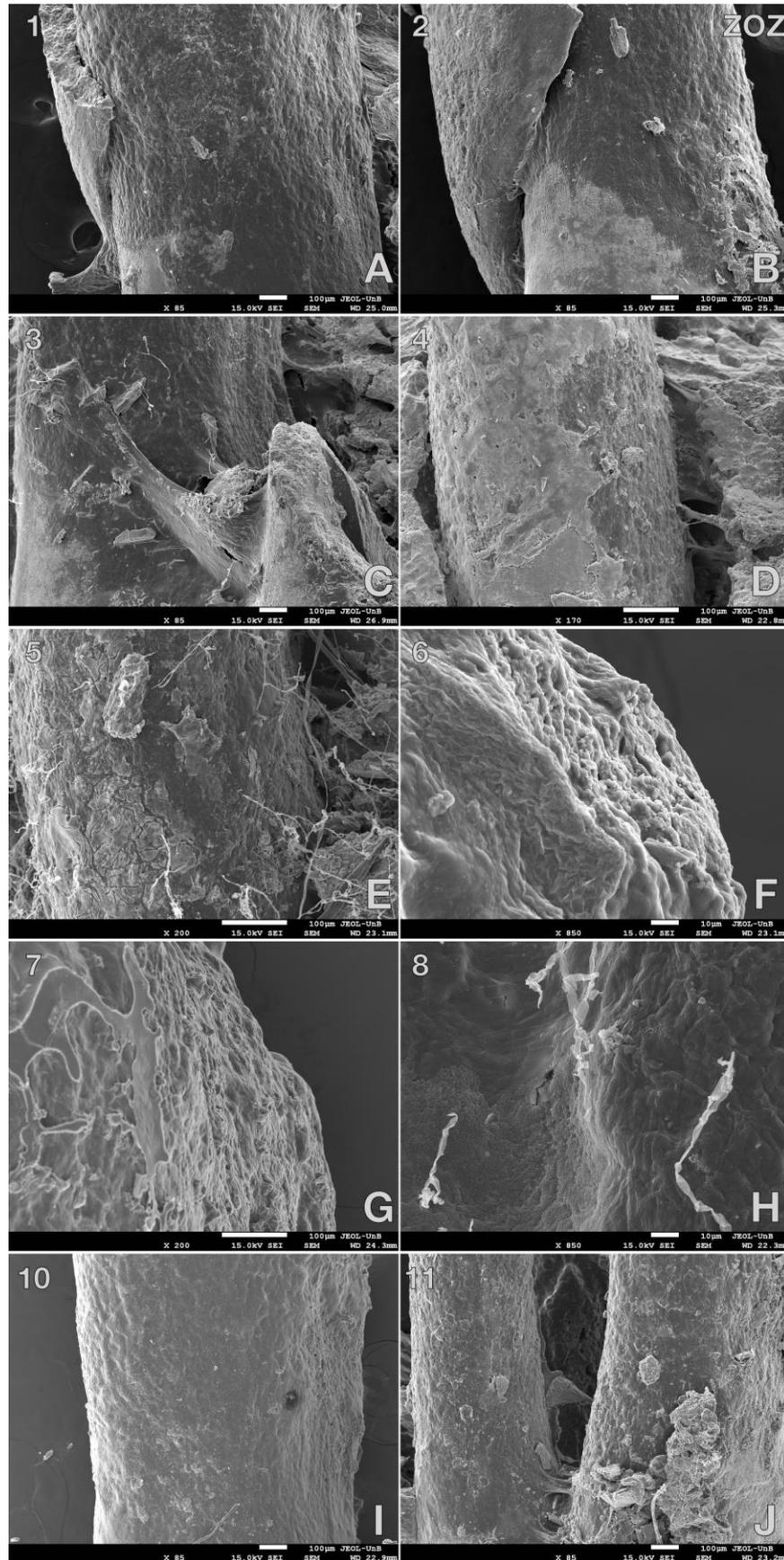


Figura 17 – Corpos radiculares dos primeiros molares inferiores esquerdos extraídos do grupo ZOZ. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Aumentos: A, B, C, I e J=85X; D=170X; E e G=200X; F e H=850X

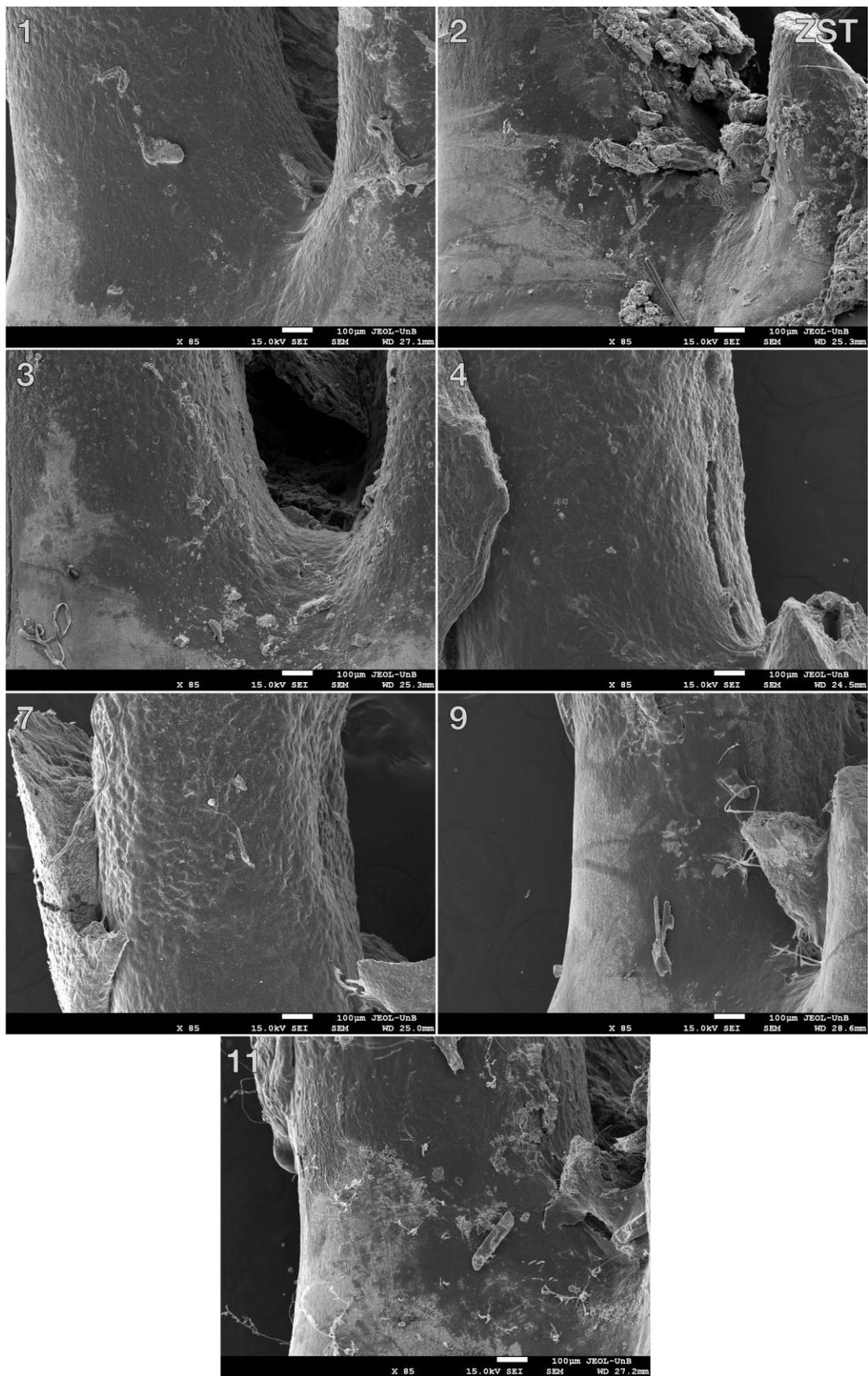


Figura 18 – Corpos radiculares dos primeiros molares inferiores esquerdos extraídos do grupo ZST. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Aumento: 85X

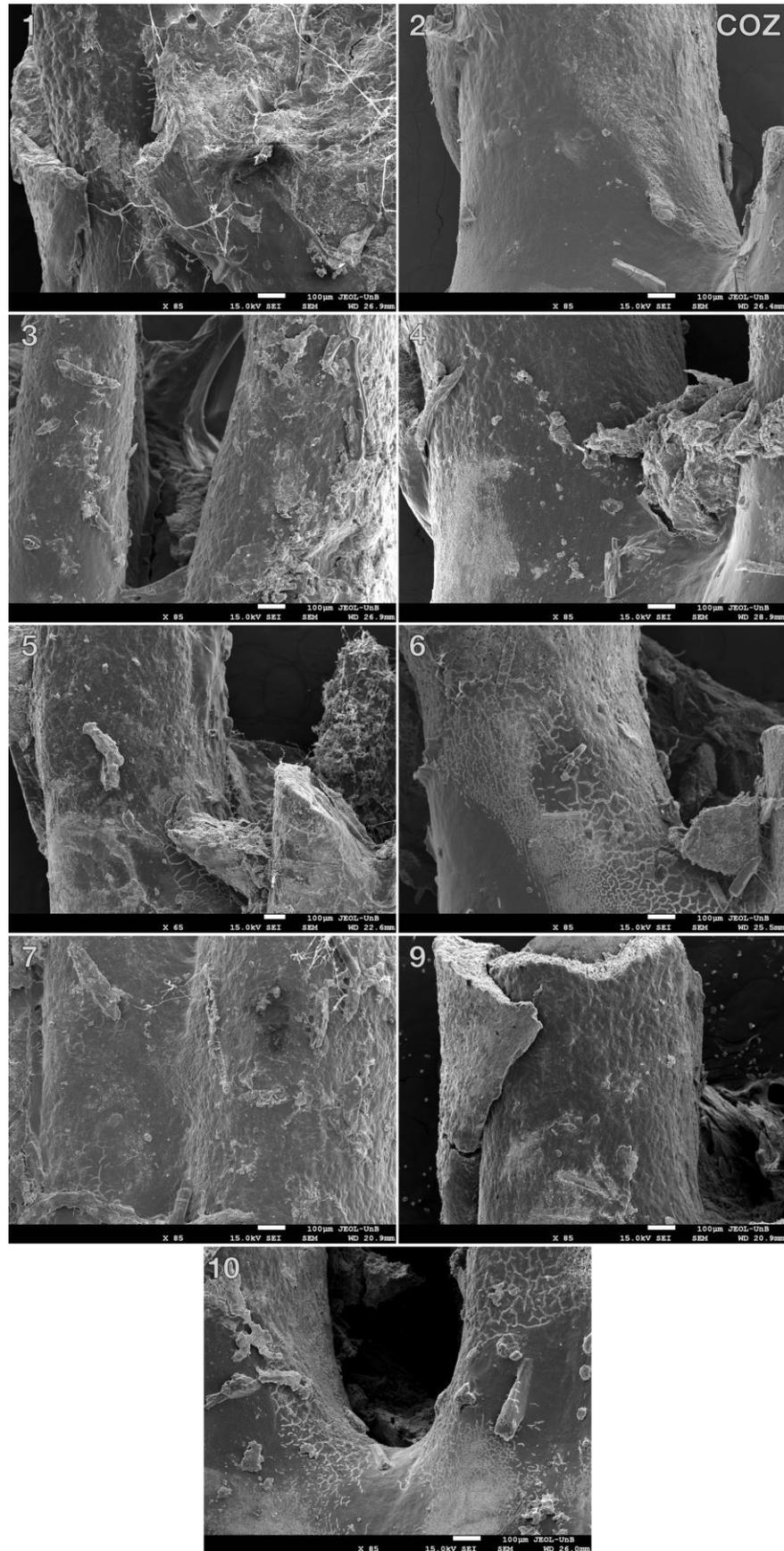


Figura 19 – Corpos radiculares dos primeiros molares inferiores esquerdos extraídos do grupo COZ. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Aumento: 85X

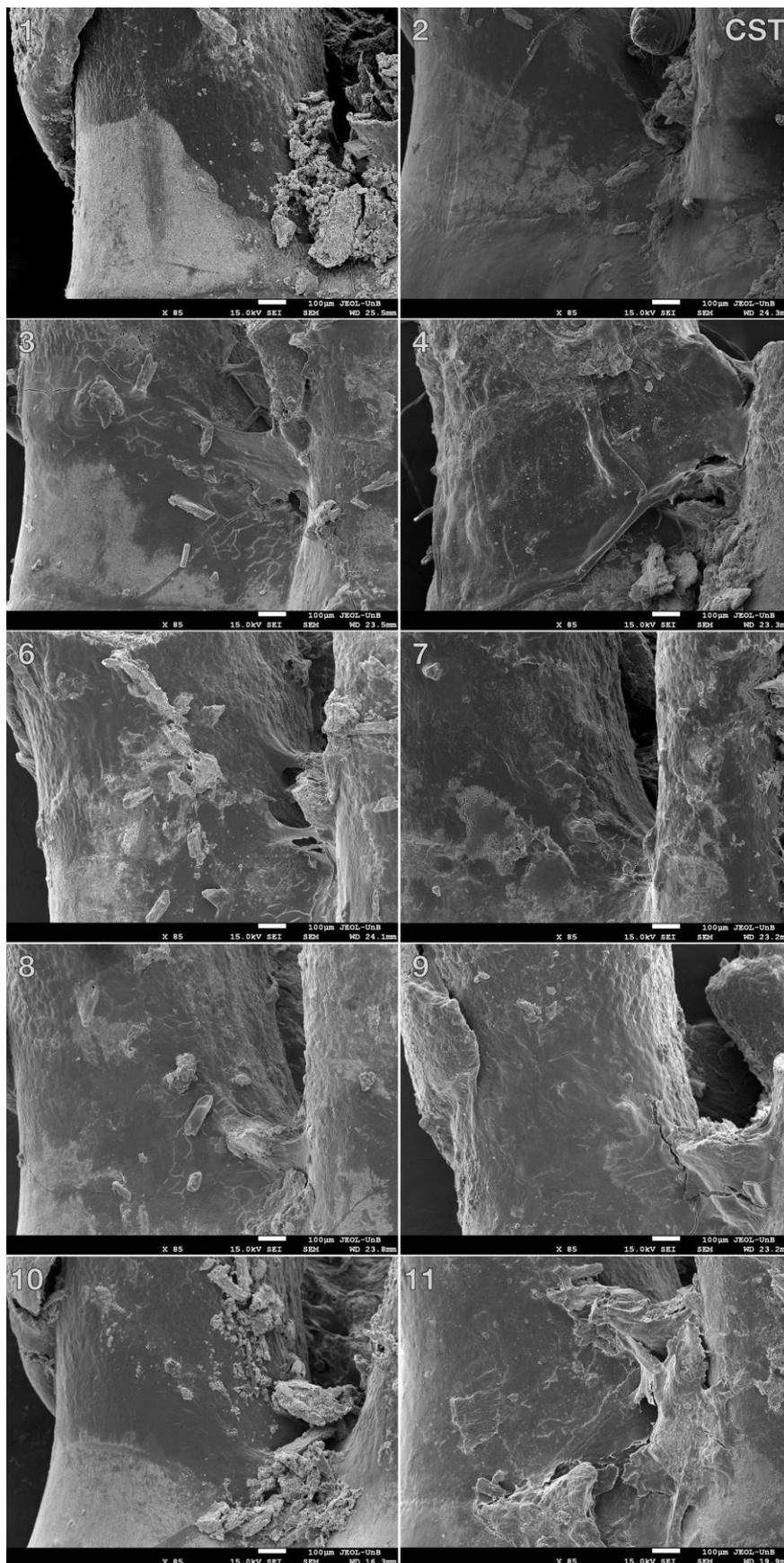


Figura 20 – Corpos radiculares dos primeiros molares inferiores esquerdos extraídos do grupo CST. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Aumento: 85X

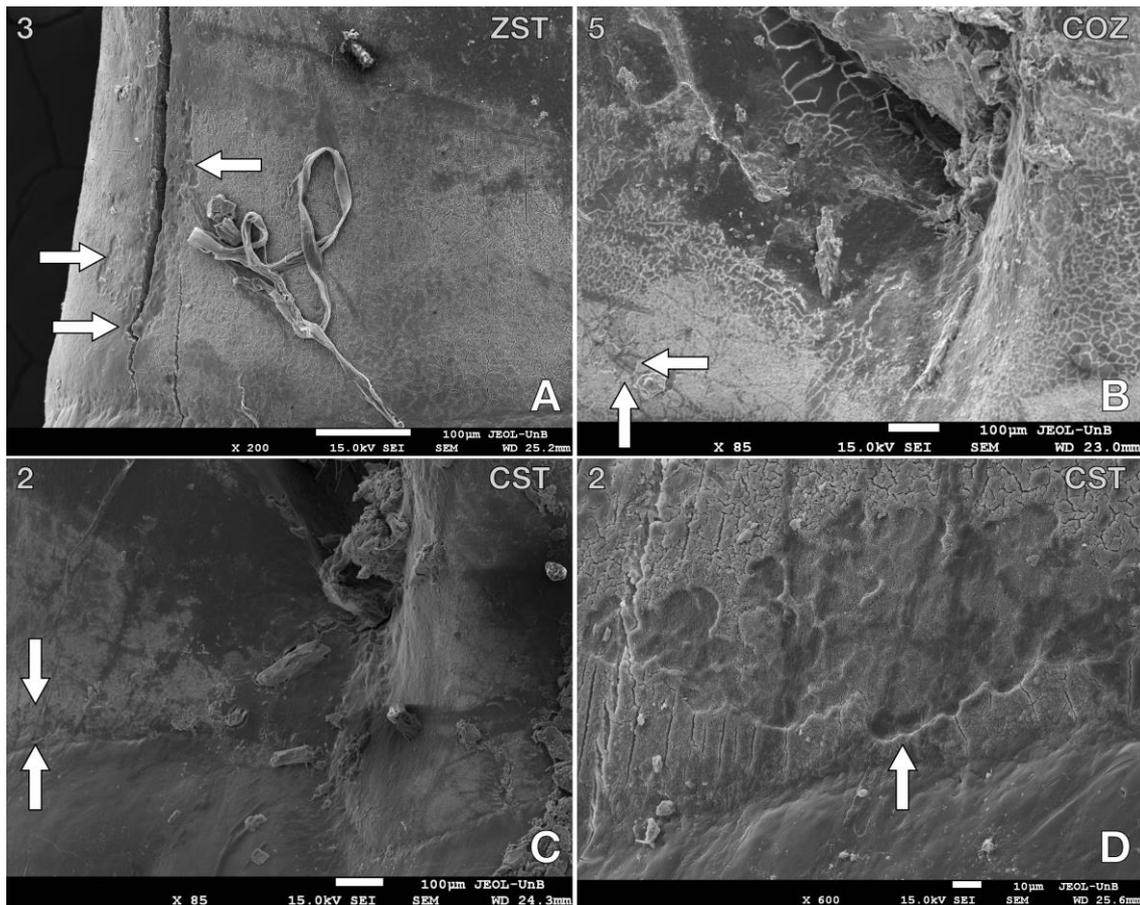


Figura 21 – Perdas estruturais compatíveis com reabsorções dentárias na superfície do cimento nos grupos ZST, COZ e CST, respectivamente. A: Grupo ZST; setas indicam reabsorções superficiais de bordos irregulares adjacentes a uma trinca radicular longitudinal, provocada, provavelmente, por forças de luxação durante a exodontia. B: Grupo COZ; setas indicam reabsorções de bordos irregulares ainda mais rasas. C: Grupo CST; setas indicam reabsorções de bordos irregulares adjacentes à junção cimento-esmalte. D: Grupo CST; imagem C em maior aumento. Animal doador identificado pela numeração presente no canto superior esquerdo de cada imagem. Imagens obtidas em MEV. Aumentos: A=200X, B e C=85X e D=600X

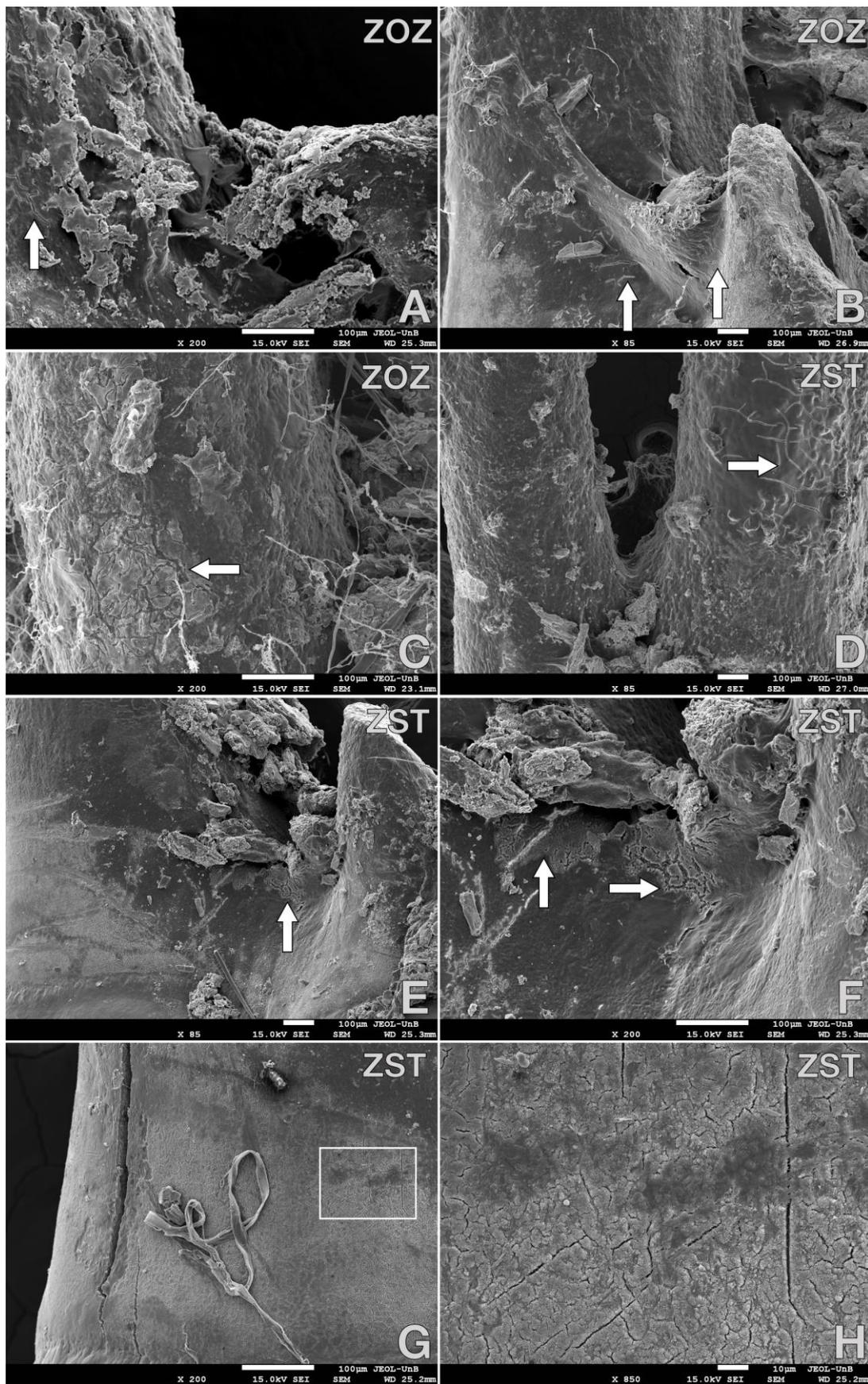


Figura 22 – Regiões craqueladas nas superfícies radiculares em áreas de furca e corpo radicular nos grupos tratados com bisfosfonatos. Imagens A (200X), B (85X) e C (200X) representam o grupo ZOZ e as imagens D (85X), E (85X), F (200X), G (200X) e H (850X), o grupo ZST

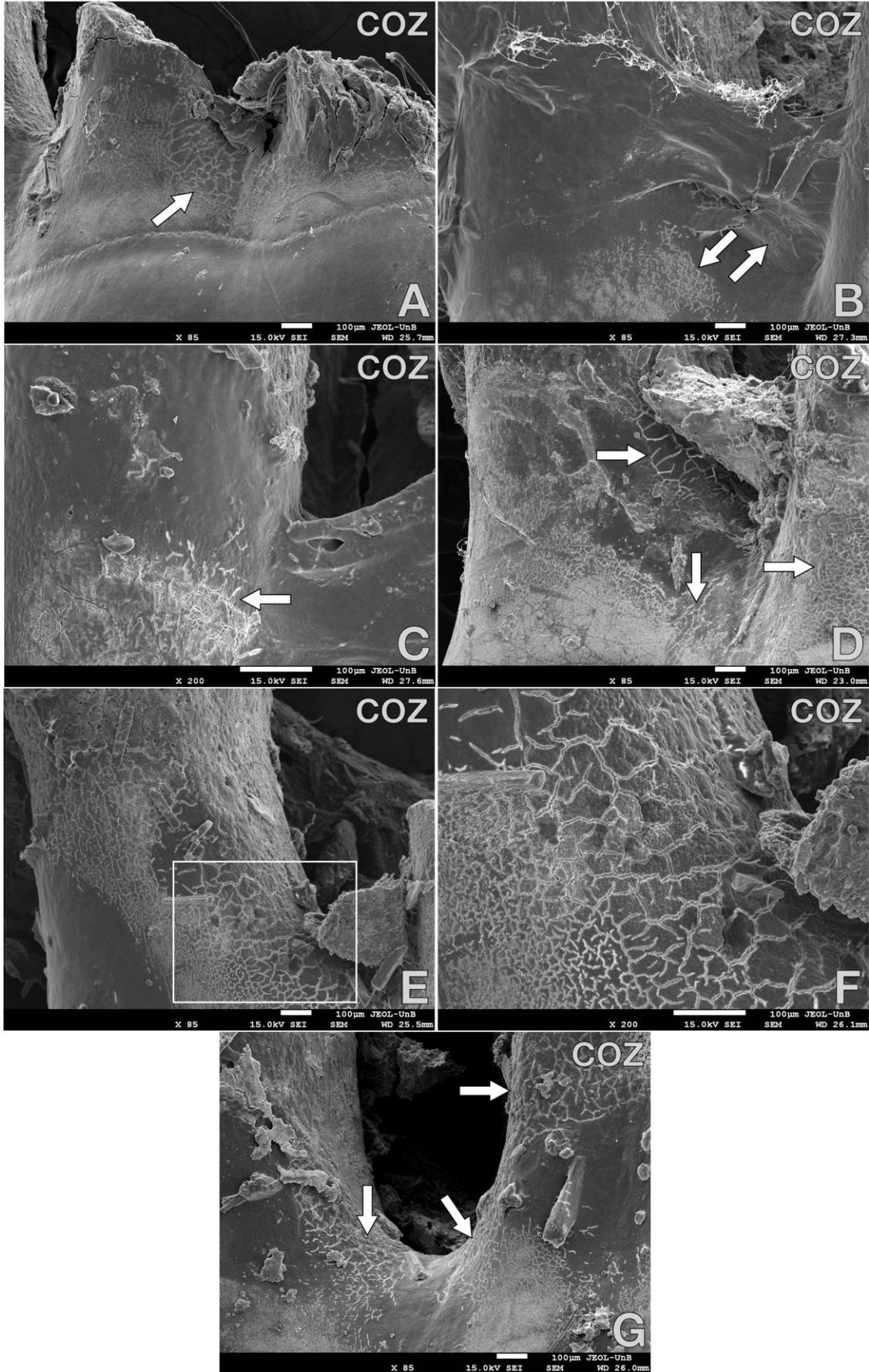


Figura 23 – Regiões craqueladas nas superfícies radiculares em áreas de furca e corpo radicular no grupo COZ. Aumentos: A, B, D, E e G=85X; C e F=200X

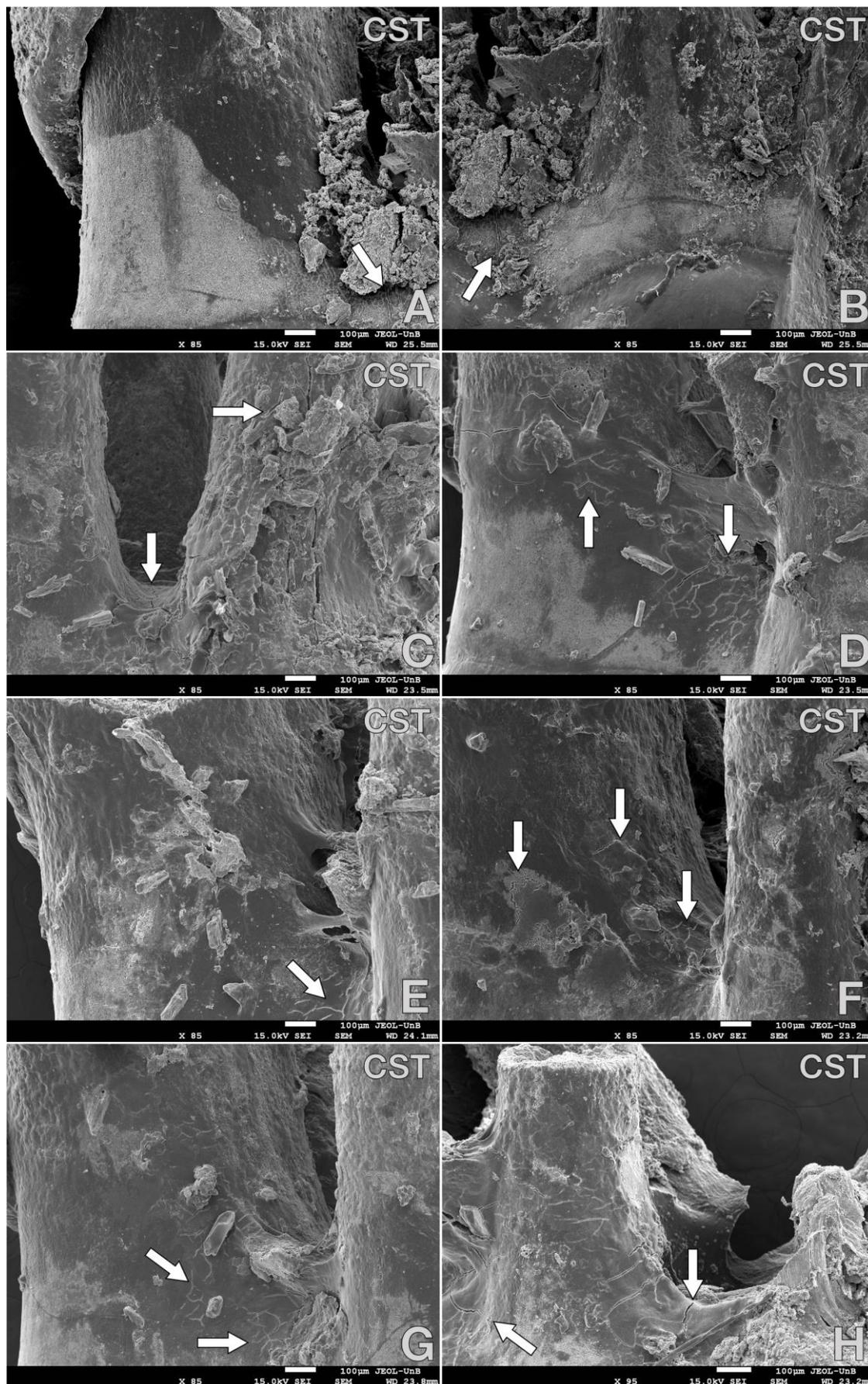


Figura 24 – Regiões craqueladas nas superfícies radiculares em áreas de furca e corpo radicular no grupo CST. Aumentos: A, B, C, D, E, F e G=85X e H=95X

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram observados, em microscopia eletrônica de varredura, os aspectos topográficos das raízes de dentes de ratos Wistar tratados com altas doses de bisfosfonatos. Durante essas análises, assim como relatado no trabalho de Vermeer et al (62), foram identificadas reabsorções rasas na superfície do cimento nos grupos ZST, COZ e CST, ocorrendo, predominantemente, no terço cervical radicular, próximo à junção cimento-esmalte.

A presença de reabsorções rasas na superfície radicular de dentes do grupo ZST é um achado inesperado e surpreendente, já que os BFs são usados como tratamento para inibir a atividade dos osteoclastos e o efeito estimulante do BFs sobre os osteoclastos foi, até o momento, pouco relatado.

Uma explicação para esse fenômeno pode ser semelhante ao mecanismo de indução da atividade osteoclástica durante o movimento dentário ortodôntico. A carga mecânica estimula a reabsorção óssea na direção da carga (66). Além disso, sob forças compressivas, os fibroblastos do ligamento periodontal induzem a osteoclastogênese (67). Especula-se que, por carga mecânica, os osteoclastos se acumulem na raiz após o tratamento com BF. O aumento do volume ósseo após o tratamento com BFs pode induzir uma carga mecânica, a qual é transmitida através do ligamento periodontal e, subsequentemente, induz a reabsorção radicular para dar espaço ao osso recém-formado. Sob condições estáticas, o espaço ligamentar periodontal seria afetado apenas levemente (62). Porém, após o movimento ortodôntico, o espaço do ligamento periodontal desaparece quase completamente no local de pressão onde a reabsorção radicular estava ocorrendo (66).

Hiraga et al (13) relatou a ocorrência de reabsorção dentinária odontoclástica em alguns ratos tratados com injeções únicas ou semanais de BFs. Curiosamente, o mesmo efeito não foi observado em animais tratados com injeções diárias. Embora o mecanismo pelo qual a reabsorção clástica dentária tenha sido induzida permaneça desconhecido, o autor especulou que a perda do epitélio do esmalte, que normalmente cobre a superfície vestibular dos incisivos, possa desencadear a reabsorção da matriz dentária exposta dos incisivos não irrompidos.

Contrariamente, estudos anteriores sobre o efeito dos BFs durante o tratamento ortodôntico relataram um efeito inibidor desse medicamento na reabsorção

radicular durante o movimento dentário ortodôntico (66). No entanto, em regime de tratamento com zoledronato aplicado sem forças externas, pelo menos 9 a 15% dos osteoclastos radiculares permanecem ativos (62).

Portanto, no modelo de movimento dentário ortodôntico, os osteoclastos radiculares podem ser mais expostos ao BF do que os osteoclastos do modelo estático devido à sua proximidade com o osso alveolar contendo BF. Isso pode explicar por que a reabsorção radicular no modelo de movimento ortodôntico foi inibida pelos BFs, enquanto os BFs estimularam a reabsorção radicular no modelo estático. Possivelmente, aqueles osteoclastos associados a raízes de molares foram menos expostos a BFs, uma vez que pouco BF se acumula no cimento radicular (68). Assim, embora os BFs possam suprimir a reabsorção radicular induzida pelo movimento dentário, a reabsorção radicular na presença de BFs em animais que não foram submetidos ao movimento dentário é ainda maior que aquela medida em camundongos do grupo controle (66).

Tomados em conjunto, esses resultados mostram que, sob a influência dos BFs, os osteoclastos estão associados ao cimento dentário e reabsorvem ativamente. Além disso, os BFs afetam diferencialmente a reabsorção das raízes de dentes molares sob condições estáticas e carregadas mecanicamente (62).

Tendo em vista que os grupos COZ e CST não foram submetidos ao tratamento com BF, as reabsorções superficiais identificadas no cimento desses grupos devem ser explicadas à luz da etiopatogenia tradicional das reabsorções cervicais externas.

As reabsorções cervicais externas geralmente apresentam seus primeiros focos na região cervical do dente afetado e, inicialmente, envolvem apenas o ligamento periodontal, cimento e dentina (69). Para que as reabsorções cervicais externas ocorram e se propaguem, supõe-se que haja danos ao ligamento periodontal e ao cimento e, adicionalmente, um fator estimulante que induza e mantenha a atividade das células clásticas. História prévia de traumatismo dentário ou tratamento ortodôntico são os fatores mais comumente associados às reabsorções cervicais externas (70).

Os animais, no presente estudo, não foram submetidos a estímulos que pudessem provocar traumas dentários, pois recebiam dieta de textura macia (ração para roedores), e não receberam tratamento ortodôntico. No entanto, a literatura sobre histopatologia e diagnóstico das reabsorções cervicais externas é limitada e, por esse motivo, a etiologia das reabsorções permanece pouco compreendida, podendo haver

fatores etiológicos que ainda não foram identificados (71). Assim, são necessárias novas pesquisas para que seja confirmada a relação de causa e efeito desses fatores etiológicos sugeridos.

Em apoio aos achados de Nelson-Filho et al (56) e Paglioni et al (61), os quais defenderam que a exposição aos BFs não causa alterações estruturais nos tecidos mineralizados e não leva a mudanças na micromorfologia do cemento e do ligamento periodontal, o grupo ZOZ não apresentou reabsorções nas superfícies radiculares dos dentes molares de ratos.

De acordo com Martins-Ortiz (19), os íons minerais e outros componentes dos tecidos dentários duros, uma vez incorporados na estrutura dentária não mais são removidos naturalmente, pois os dentes, ao contrário dos ossos, não atuam como reservatório mineral ou protéico no organismo humano. A remoção dos componentes ocorre apenas em condições patológicas, no processo de reabsorção dentária. Durante os estados osteopênicos e osteoporóticos não há envolvimento das superfícies radiculares, pois estão protegidas pela camada cementoblástica.

Adicionalmente, Consolaro (72) afirmou que a remodelação óssea não envolve os dentes, apesar de estar ocorrendo a apenas 250µm de distância da superfície cementária, aproximadamente. Isso porque, na superfície radicular, os cementoblastos não apresentam receptores para os mediadores químicos promotores do turnover ósseo.

Já foi relatado que o alendronato, utilizado tanto como medicação tópica quanto intracanal, melhorou a cicatrização em dentes avulsionados, apresentando efeitos antirreabsortivos através da estimulação indireta dos osteoblastos e da diminuição da atividade dos osteoclastos. No entanto, não inibiu a reabsorção de substituição de raízes reimplantadas (73). De acordo com estudos prévios, isso poderia ser causado, em parte, pelas altas concentrações de alendronato utilizadas, que são citotóxicas para as células periodontais (74–76).

Como anteriormente relatado e discutido, grupo COZ apresentou reabsorções nas superfícies radiculares dos dentes molares de ratos. Porém, o grupo ZOZ não apresentou essas mesmas alterações. Não foram localizados, na literatura, trabalhos que apontem a correlação entre o uso da ozonioterapia e um efeito protetor ou causador de reabsorções nas superfícies radiculares ou quaisquer outras alterações dentárias. Isso reforça a necessidade de novos estudos, os quais poderão validar a suspeita de que a terapia com ozônio não afeta as estruturas dentárias.

As imagens em MEV do presente estudo demonstraram, ainda, regiões de micro fraturas, ou trincas, em diferentes comprimentos e profundidades nas superfícies radiculares de todos os grupos. Para facilitar a descrição, tais regiões foram chamadas de "craqueladas". Essas alterações foram visualizadas predominantemente em áreas de furca e corpo radicular de dentes molares de ratos.

No ano de 2010, o estudo de Hoefert et al (16), através de microscopia eletrônica de varredura, mostrou um alto número de microfissuras em amostras ósseas de pacientes com MRONJ. Esses dados contrastaram com amostras de ossos de pacientes que apenas estavam sob medicação com BFs, as quais apresentaram menos fraturas. Esses defeitos foram descritos como *microcracks*, apresentando um aspecto semelhante ao visto na superfície radicular de alguns dentes do presente estudo.

Entretanto, os craquelados aqui apresentados tiveram sua causa atribuída às forças de luxação aplicadas durante a exodontia, as quais promoveram pequenas rupturas estruturais nas superfícies radiculares, dissipando-se nessa conformação específica.

As fraturas radiculares parciais ou totais da lâmina alveolar e do osso inter-radicular, outros resultados já relatados no presente estudo, ocorreram, provavelmente, pelas forças de luxação aplicadas sobre os dentes durante as exodontias. Há poucos relatos na literatura que sustentem a correlação entre o uso de BF e uma possível alteração das estruturas de dentina e cemento ou fusão das raízes ao osso (10,13,57), as quais poderiam acarretar em uma fragilização das raízes e/ou dificuldade de sua remoção do alvéolo. Essas alterações seriam justificativas alternativas para ocorrência das fraturas identificadas. Uma outra alternativa seria a anatomia complexa das raízes de dentes de ratos (77), a qual dificulta ainda mais a remoção da estrutura radicular hígida do interior do alvéolo.

Uma grande variedade de condições e drogas pode perturbar a formação normal e a mineralização dos dentes. Tratando-se dos efeitos dos BFs administrados sistemicamente sobre tecidos dentários mineralizados, a literatura relatou dados conflitantes, provavelmente devido a diferenças na metodologia empregada, como dose e via de administração (54,61,78,79).

Moraes et al (10) demonstraram que o tratamento com BF pode estar associado a alterações dentárias, como a anquilose, com fusão de cemento e dentina ao osso

alveolar, e a formação de cimento atípico na superfície radicular apical (hipercementose), o qual é composto por cimento celular e acelular.

Em apoio as esses achados, Hiraga et al (13) constataram a fusão de molares ao osso alveolar, a chamada anquilose, em animais tratados com BF. Em seu estudo, que avaliava os efeitos da administração de BF durante a odontogênese na formação e erupção dentária em ratos, foi constatado que o tratamento com BFs durante a odontogênese tem o potencial de inibir a erupção, prejudicar a formação dentária e induzir vários tipos de anormalidades nos dentes. Estes resultados sugerem que a anquilose observada em animais tratados com BF é provavelmente induzida em associação com a impactação dentária. Em contraste, relatos prévios mostraram que o pré-tratamento de raiz com alendronato preveniu a anquilose de curto prazo após o reimplante de molares de ratos avulsionados (78).

Os mecanismos de ação dos bisfosfonatos têm sido amplamente estudados, mas ainda não são completamente compreendidos. A anquilose pode ser explicada por alterações na remodelação óssea, com ação antirreabsortiva, através da perda da função osteoclástica pela inibição da via do mevalonato (80).

O estudo de Rothbarth et al (57) revelou que o tratamento com alendronato provocou locais de anquilose em dentes luxados e não luxados e prejudicou a atividade de reabsorção dos osteoclastos, que permaneceram em um estágio latente. Adicionalmente, ele foi capaz de atenuar as alterações nos tecidos radiculares e periodontais após a luxação lateral dos molares de ratos, sem prejudicar o desenvolvimento radicular. Além disso, o alendronato não impediu a diferenciação dos cementoblastos, porém, um cimento menos celular foi formado em espécimes tratados com esse BF.

Entretanto, apesar desses estudos haverem demonstrado a possibilidade de tais alterações das estruturas radiculares e da ocorrência de anquilose (10,13,57), a presente pesquisa, com a ferramenta de análise superficial utilizada – microscopia eletrônica de varredura, não foi capaz de identificá-las nos grupos estudados. Os resultados podem ser diferentes ao utilizar-se uma nova ferramenta, como a microscopia ótica, visualizando-se a estreita relação da raiz dentária com o osso alveolar.

Outro resultado do presente estudo foi a identificação de um cimento com estrutura mais rugosa e volumosa nas porções mais próximas do ápice radicular em todos os grupos, quando comparado ao cimento das regiões média e cervical (corpo)

radiculares. Entretanto, pelo elevado número de fraturas, especialmente apicais, não foi possível identificar com clareza essa possibilidade anatômica.

A hiper cementose tem sido demonstrada em estudos de tecidos dentais de desenvolvimento em molares de ratos. A formação de uma grande quantidade de tecido semelhante ao osteóide, referida como cimento hiperplásico atípico, foi observada nesses estudos na superfície da raiz e no osso alveolar (54,79). No entanto, não é possível diferenciar as condições descritas nessas pesquisas daquelas descritas em dentes que respondem a causas irritantes ou ao processo de envelhecimento.

Apesar desses achados descritos na literatura, o cimento com estrutura mais rugosa e volumosa nas porções mais próximas do ápice radicular identificado no presente estudo não pode ser classificado como hiper cementose. No estudo de Paglioni et al (61), nenhuma diferença estatisticamente significativa foi detectada entre os grupos teste e controle em relação à espessura do cimento. Nesse experimento, a idade média dos pacientes de teste e controle foi muito semelhante. Sabendo que o cimento torna-se mais espesso ao longo da vida, os autores sugeriram que a hiper cementose observada é considerada um evento fisiológico, em vez de uma mudança causada pelo uso de BFs. Além disso, os valores da espessura do cimento no grupo teste são semelhantes aos valores normais em pacientes adultos encontrados na literatura. Embora não seja viável a comparação de trabalhos com humanos e animais, no presente estudo, não foram identificadas diferenças entre os grupos avaliados.

Em apoio a estes achados, a falta de diferenças detectáveis no número de linhas incrementais de cimento, inflamação do ligamento periodontal e distribuição de fibroblastos no ligamento entre os dois grupos estudados sugeriu que a exposição aos BFs intravenosos não leva a mudanças na micromorfologia do cimento e do ligamento periodontal em pacientes com câncer (61).

Por outro lado, Moraes et al (10), em seu estudo não controlado com dentes humanos extraídos de pacientes submetidos a tratamento com BF intravenoso e que desenvolveram MRONJ, concluíram que, além da hiper cementose e da anquilose, outras alterações dentárias relacionadas aos BFs foram necrose pulpar, calcificação pulpar e obliteração da câmara pulpar. No entanto, tais estudos não utilizaram um grupo controle e realizaram uma análise descritiva e subjetiva. Além disso, a maioria

dos participantes eram pacientes idosos, caso em que a aposição de cimento relacionada à idade poderia ser confundida com hiper cementose.

Sabe-se que o envelhecimento animal inclui uma série de alterações teciduais interdependentes, incluindo a aposição de cimento (49). No momento das exodontias, os animais estavam com, aproximadamente 102 dias de vida. De acordo com Martins-Ortiz (19), nessa idade, a rizogênese encontra-se em fase de formação do terço apical, e, logo, as raízes não estão totalmente formadas. Por esse motivo, não se pode afirmar que a estrutura mais rugosa e volumosa visualizada nos ápices radiculares deveu-se uma aposição de cimento acumulada com a idade.

Geralmente, a faixa de cobertura do cimento acelular é diferente entre os vários tipos de dentes, estando sobre cerca da metade cervical a um terço do comprimento radicular nos dentes multirradiculados. Sua espessura normal, que aumenta com a idade, varia de 50 a 200 μm . Já o cimento celular, predominantemente visto nas regiões interradicular e apical das raízes, apresenta espessura normal máxima variando entre 700 e 1500 μm em molares. Nos molares, o cimento celular geralmente cobre dois terços apicais das raízes (44,46). Assim, o volume acentuado de cimento nas porções mais próximas do ápice radicular observado no presente estudo está de acordo com os aspectos anatômicos descritos na literatura.

Embora os mecanismos de ação dos BFs tenham sido exaustivamente estudados no osso, pouco se sabe sobre seus efeitos no desenvolvimento dentário, e apenas alguns estudos sobre a associação entre defeitos dentários e o uso desses compostos químicos estão disponíveis (13,20,43,56,59).

No trabalho de Nelson-Filho et al (56), a análise química quantitativa revelou a presença de alendronato de sódio nos tecidos dentais mineralizados de dentes de ratos (0,0018% por dente) após a administração sistêmica deste fármaco, o que indica que ele está biodisponível no organismo durante a formação dos dentes. Entretanto, não foram observadas alterações estruturais nos tecidos mineralizados por MEV após exposição ao alendronato sódico sistêmico. A análise do esmalte e da dentina não evidenciou alterações morfológicas na matriz extracelular. Aquela quantidade de alendronato encontrada de 0,0018% por dente provavelmente não foi suficiente para causar alterações significativas de acordo com os parâmetros testados. No entanto, é um achado valioso que confirma a forte afinidade do alendronato pela hidroxiapatita e sua rápida incorporação à matriz de tecidos mineralizados, incluindo dentes, durante

a fase de mineralização. Assim, são necessários mais estudos para investigar quais efeitos podem surgir após a incorporação de BF nos tecidos dentários, como, por exemplo, se ele pode alterar sua estrutura.

Em se estudo, Hiraga et al (13) observou diversas anormalidades dentárias em incisivos relacionadas ao uso de BFs. Uma delas é a formação de material semelhante à dentina na polpa, o qual acabou preenchendo a cavidade pulpar com uma matriz mineralizada. Também relatou que o BF induziu formações semelhantes a odontomas ao redor da extremidade basal dos incisivos, mas os mecanismos subjacentes ao desenvolvimento desses odontomas não ficaram claros. Foi demonstrado, ainda, que BFs não-nitrogenados, como etidronato e clodronato, que têm efeitos inibitórios na mineralização e na reabsorção óssea, causam hipomineralização do esmalte e da dentina. Por outro lado, esses achados não foram relatados no tratamento com bisfosfonatos nitrogenados. No geral, esses resultados sugerem que as anormalidades dentárias mostradas neste estudo são causadas principalmente por efeitos indiretos, e não diretos, dos BFs nos germes dentários. Assim, mais estudos são necessários para entender completamente o mecanismo envolvido.

Por fim, analisando germes de dentes molares de ratos recém-nascidos, é possível verificar que a administração da droga nos estágios iniciais da odontogênese resulta em distúrbios e defeitos mais evidentes nos tecidos dentários duros (59).

O desenvolvimento dentário ocorre quando o osso adjacente é reabsorvido pelos osteoclastos, e o cálcio e o fosfato séricos são atraídos para formar hidroxiapatita nas estruturas dentárias em desenvolvimento. Por essas razões, espera-se que os BFs possam afetar a o desenvolvimento dos dentes. Publicações anteriores indicam que a perturbação no processo de mineralização induzida por BFs é devida aos efeitos físico-químicos da droga na formação e agregação de cristais. Distúrbios na erupção dentária, desenvolvimento e mineralização estão entre os efeitos colaterais relatados por alguns BFs (20).

Bradaschia-Correa et al (43) exibiram inibição na formação e erupção das raízes de dentes molares em ratos jovens tratados com alendronato, mostrando comprometimento na ativação dos osteoclastos, que permaneceram em estágio latente.

A pesquisa em animais e seu valor para a experiência humana permanecem controversos. Cada espécie animal diferencia-se por uma ampla gama de características clínicas e histopatológicas. Espécies diferentes possuem traços,

hábitos, expectativa de vida, estruturas teciduais, mecanismos de defesa e características imunológicas e genéticas distintas (49). Independentemente de quantos dados possam ser apresentados, é inadequado esperar que diferentes espécies respondam de forma idêntica ou similar ao mesmo desafio, exceto dentro de limites muito restritos.

Resultados obtidos em estudos com modelos animais não traduzem necessariamente desfechos clínicos esperados em humanos. Entretanto, eles são de grande importância, especialmente para estudos inviáveis ou de difícil realização em humanos, e constituem um importante passo da pesquisa, fornecendo tendências biológicas antes de prosseguir para a aplicação clínica (53). Assim, estudos bem planejados em humanos são necessários para estabelecer a eficácia e segurança dos BFs.

Os presentes resultados mostram que o MEV é uma ferramenta valiosa no estudo dos detalhes da organização topográfica radicular normal e induzida por BF. No entanto, deve-se notar que os procedimentos de preparação da amostra aqui usados dificultaram a investigação da superfície radicular atípica. Para visualização de superfícies mineralizadas dos dentes, não há necessidade de nenhum preparo prévio à metalização, apenas remoção das sujidades visíveis com gaze e soro. Entretanto, os filamentos de gaze, e outras impurezas não identificadas, dificultaram a observação das superfícies radiculares. Para estudos futuros, um preparo de superfície mais meticuloso é sugerido.

Outra limitação dessa pesquisa foi o equívoco do biotério ao fornecer 5 animais fêmeas, as quais precisaram ser excluídas do estudo na fase pré-operatória por risco de procriação. Essa exclusão comprometeu, em especial, o grupo ZST, o qual perdeu 4 animais de sua amostra, dificultando a comparação desse grupo com os demais e limitando a obtenção de resultados mais precisos e detalhados. Adicionalmente, um rato do grupo ZOZ morreu antes do período programado para as exodontias e um dente do grupo COZ fraturou totalmente durante sua extração.

As fraturas radiculares parciais ou totais, as quais ocorreram indiscriminadamente em todos os grupos durante as exodontias, também comprometeram a qualidade das análises. Essas fraturas foram atribuídas à dificuldade técnica, à anatomia radicular e à friabilidade das estruturas.

Por inviabilidade do procedimento, não foi aplicado cegamento a nenhum dos operadores em nenhuma das fases. Além disso, por ser esse um estudo de análise

descritiva dos resultados, não foram obtidos dados numéricos ou padronizados, inviabilizando a realização de uma análise estatística.

Dadas as considerações anteriormente abordadas e com base nas condições metodológicas, resultados e limitações do presente estudo, a hipótese nula foi aceita, pois este estudo mostra que não houve alterações morfológicas na topografia radicular de dentes molares de ratos Wistar submetidos a tratamento com bisfosfonato injetável (ácido zoledrônico), resultados que confirmam os achados da literatura (56), não havendo diferença superficial entre os grupos estudados.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os dados obtidos a partir das análises do presente estudo e com base em relatos anteriores da literatura, conclui-se que, até o momento, não existem indícios suficientes de que a administração periódica de BFs (ácido zoledrônico), pelo tempo, via de administração e concentração aplicados, possa causar alterações morfológicas na topografia radicular de dentes molares de ratos Wistar, ao menos superficialmente. Adicionalmente, a ozonioterapia não se mostrou benéfica ou maléfica para a integridade da superfície radicular. Assim, novas pesquisas são de grande importância para estabelecer definitivamente a segurança na utilização dos BFs para as estruturas dentárias.

7 REFERÊNCIAS

1. Krüger TB, Herlofson BB, Landin MA, Reseland JE. Alendronate alters osteoblast activities. *Acta Odontol Scand Soc* [Internet]. 2016;74(7):550–7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/00016357.2016.1217041>
2. Goodchild JH, Donaldson M. What do you really need to know about bisphosphonates? *Academy of General Dentistry*. 2018. p. 28.
3. Fleisch H. Pharmacology and use in the treatment of tumour-induced bisphosphonates. *Drugs*. 1991;42(6):919–44.
4. Francis MD, Valent DJ. Historical perspectives on the clinical development of bisphosphonates in the treatment of bone diseases. 2007;7(1):2–8.
5. Fleisch H. Diphosphonates: history and mechanisms of action. *Metab Bone Dis Rel Res*. 1981;4 & 5:279–87.
6. Kavanagh KL, Guo K, Dunford JE, Wu X, Knapp S, Ebetino FH, et al. The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(20):7829–34.
7. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American association of oral and maxillofacial surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw - 2014 update. *J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2014;72(10):1938–56. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2014.04.031>
8. Campisi G, Fedele S, Fusco V, Pizzo G, Di Fede O, Bedogni A. Epidemiology, clinical manifestations, risk reduction and treatment strategies of jaw osteonecrosis in cancer patients exposed to antiresorptive agents. *Futur Oncol*. 2014;10(2):257–75.
9. Landesberg R, Woo V, Cremers S, Cozin M, Marolt D, Vunjak-Novakovic G, et al. Potential pathophysiological mechanisms in osteonecrosis of the jaw. *Mol Psychiatry*. 2015;20(6):1588–95.
10. Moraes P de C, Silva CAB, Soares AB, Passador-Santos F, Corrêa MEP, Araújo NS de, et al. Tooth alterations in areas of bisphosphonate-induced osteonecrosis. *Clin Oral Investig*. 2015;19(2):489–95.
11. Akram Z, Abduljabbar T, Kellesarian SV, Abu Hassan MI, Javed F, Vohra F. Efficacy of bisphosphonate as an adjunct to nonsurgical periodontal therapy in the management of periodontal disease: a systematic review. *Br J Clin Pharmacol*. 2017;83(3):444–54.
12. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(9):1032–45.
13. Hiraga T, Ninomiya T, Hosoya A, Nakamura H. Administration of the bisphosphonate zoledronic acid during tooth development inhibits tooth eruption and formation and induces dental abnormalities in rats. *Calcif Tissue Int*. 2010;86(6):502–10.
14. Jobke B, Milovanovic P, Amling M, Busse B. Bisphosphonate-osteoclasts: changes in osteoclast morphology and function induced by antiresorptive nitrogen-containing bisphosphonate treatment in osteoporosis patients. *Bone* [Internet]. 2014;59:37–43. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2013.10.024>
15. Mignot MA, Taisne N, Legroux I, Cortet B, Paccou J. Bisphosphonate drug holidays in postmenopausal osteoporosis: effect on clinical fracture risk.

- Osteoporos Int. 2017;28(12):3431–8.
16. Hoefert S, Schmitz I, Tannapfel A, Eufinger H. Importance of microcracks in etiology of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a possible pathogenetic model of symptomatic and non-symptomatic osteonecrosis of the jaw based on scanning electron microscopy findings. *Clin Oral Investig*. 2010;14(3):271–84.
 17. Fung PL, Nicoletti P, Shen Y, Porter S, Fedele S. Pharmacogenetics of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* [Internet]. 2015;27(4):537–46. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coms.2015.06.005>
 18. Shah NP, Nayee S, Pazianas M, Sproat C. Beyond ONJ - a review of the potential uses of bisphosphonates in dentistry. *Br Dent J* [Internet]. 2017;222(9):727–30. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bdj.2017.412>
 19. Martins-Ortiz MF. Influência dos bisfosfonatos na movimentação dentária induzida, na frequência e nas dimensões das reabsorções radiculares associadas. Bauru. Universidade de São Paulo; 2004.
 20. Soares AP, Santo RF do E, Line SRP, Pinto M das GF, Santos P de M, Toralles MBP, et al. Bisphosphonates: pharmacokinetics, bioavailability, mechanisms of action, clinical applications in children, and effects on tooth development. *Environ Toxicol Pharmacology* [Internet]. 2016;42(212–217):1–19. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.01.015>
 21. Frith JC, Mönkkönen J, Blackburn GM, Russell RGG, Rogers MJ. Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'- (B,Y-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. *J Bone Miner Res*. 1997;12(9):1358–67.
 22. Lehenkari PP. Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. *Mol Pharmacol*. 2002;61(5):1255–62.
 23. Fromigué O, Body JJ. Bisphosphonates influence the proliferation and the maturation of normal human osteoblasts. *J Endocrinol Invest*. 2002;25(6):539–46.
 24. Viereck V, Emons G, Gründker C, Lauck V, Hofbauer LC, Frosch KH, et al. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;291(3):680–6.
 25. Coskun Benlidayi I, Guzel R. Oral bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw: a challenging adverse effect. *ISRN Rheumatol*. 2013;2013(2):1–6.
 26. Marx RE. Pamidronate (aredia) and zoledronate (zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2003;61:1115–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22765362>
 27. Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005;63(11):1567–75.
 28. Franco-Pretto E, Pacheco M, Moreno A, Messa O, Gnecco J. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: clinical, imaging, and histopathology findings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* [Internet]. 2014;118(4):408–17. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oooo.2014.04.017>
 29. Pires T de L. Efeito da ozonioterapia sistêmica em ratos em uso de bisfosfonato. Universidade de Brasília; 2018.

30. Vidal-Gutiérrez X, Gómez-Clavel JF, Gaitán-Cepeda LA. Dental extraction following zoledronate, induces osteonecrosis in rat's jaw. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2017;22(2):e177–84.
31. Mitsimponas KT, Moebius P, Amann K, Stockmann P, Schlegel KA, Neukam FW, et al. Osteo-radio-necrosis (ORN) and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ): the histopathological differences under the clinical similarities. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(2):496–508.
32. Ruggiero S. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Aust Soc Endodontology* [Internet]. 2009;35:119–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19925998>
33. Miksad RA, Lai K-C, Dodson TB, Woo S-B, Treister NS, Akinyemi O, et al. Quality of life implications of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. *Oncologist*. 2011;16(1):121–32.
34. Hoefert S, Schmitz I, Weichert F, Gaspar M, Eufinger H. Macrophages and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): evidence of local immunosuppression of macrophages in contrast to other infectious jaw diseases. *Clin Oral Investig*. 2015;19(2):497–508.
35. Marx RE, Tursun R. Suppurative osteomyelitis, bisphosphonate induced osteonecrosis, osteoradionecrosis: a blinded histopathologic comparison and its implications for the mechanism of each disease. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2012;41(3):283–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2011.12.016>
36. Akashi M, Wanifuchi S, Iwata E, Takeda D, Kusumoto J, Furudo S, et al. Differences between osteoradionecrosis and medication-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Maxillofac Surg*. 2017;22(1):59–63.
37. Vescovi P, Giovannacci I, Merigo E, Meleti M, Manfredi M, Fornaini C, et al. Tooth extractions in high-risk patients under bisphosphonate therapy and previously affected with osteonecrosis of the jaws: surgical protocol supported by low-level laser therapy. *J Craniofac Surg*. 2015;26(3):696–9.
38. Kuroshima S, Sasaki M, Sawase T. Medication-related osteonecrosis of the jaw: a literature review. *J Oral Biosci* [Internet]. 2019;61(2):99–104. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.job.2019.03.005>
39. Khan AA, Morrison A, Hanley DA, Felsenberg D, McCauley LK, O’Ryan F, et al. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. *J Bone Miner Res*. 2015;30(1):3–23.
40. Grisar K, Schol M, Schoenaers J, Dormaar T, Coropciuc R, Vander Poorten V, et al. Osteoradionecrosis and medication-related osteonecrosis of the jaw: similarities and differences. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2016;45(12):1592–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2016.06.016>
41. Vermeer JAF, Jansen IDC, Marthi M, Coxon FP, McKenna CE, Sun S, et al. Jaw bone marrow-derived osteoclast precursors internalize more bisphosphonate than long-bone marrow precursors. *Bone* [Internet]. 2013;57(1):242–51. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2013.08.007>
42. Khan AA, Sándor GKB, Dore E, Morrison AD, Alsahli M, Amin EPF, et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *J Rheumatol*. 2009;36(3):478–90.
43. Bradaschia-Correa V, Massa LF, Arana-Chavez VE. Effects of alendronate on tooth eruption and molar root formation in young growing rats. *Cell Tissue Res*. 2007;330(3):475–85.

44. Yamamoto T, Hasegawa T, Yamamoto T, Hongo H, Amizuka N. Histology of human cementum: its structure, function, and development. *Jpn Dent Sci Rev* [Internet]. 2016;52(3):63–74. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdsr.2016.04.002>
45. Denton GB. The discovery of cementum. *J Dent Res*. 1939;18:239.
46. Foster BL. On the discovery of cementum. *J Periodontal Res*. 2017;52(4):666–685.
47. Diekwisch TGH. The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol*. 2001;45(5–6):695–706.
48. Bosshardt DD. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? *J Dent Res*. 2005;84(5):390–406.
49. Guvva S, Patil MB, Mehta D. Rat as laboratory animal model in periodontology. *Int J Oral Heal Sci*. 2018;7:68–75.
50. Maynard RL, Downes N. Anatomy and histology of the laboratory rat in toxicology and biomedical research. In: *Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research* [Internet]. Elsevier Inc.; 2019. Available at: <https://www.elsevier.com/books-and-journals>
51. Dammaschke T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Lab Anim* [Internet]. 2010;44:1–6. Available at: doi: 10.1258/la.2009.008120
52. Hoffman MM, Schour I. Quantitative studies in the development of the rat molar. *Am J Orthod Oral Surg*. 2004;26(9):854–74.
53. Weinberg MA, Bral M. Laboratory animal models in periodontology. *J Clin Periodontol J Clin Peri-odontol C Munksgaard*. 1999;26(26):335–40.
54. Alatli-Kut I, Hultenby K, Hammarström L. Disturbances of cementum formation induced by single injection of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP) in rats: light and scanning electron microscopic studies. *Eur J Oral Sci*. 1994;102(5):260–8.
55. Alatli I, Hammarström L. Root surface defects in rat molar induced by 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate. *Acta Odontol Scand*. 1996;54(1):59–65.
56. Nelson-Filho P, Lucisano MP, Da Silva RAB, Da Silva RS, Serra MC, Gerlach RF, et al. Systemically alendronate was incorporated into dental tissues but did not cause morphological or mechanical changes in rats teeth. *Microsc Res Tech*. 2012;75(9):1265–71.
57. Rothbarth CP, Bradaschia-Correa V, Ferreira LB, Arana-Chavez VE. Effects of the bisphosphonate alendronate on molars of young rats after lateral luxation. *Dent Traumatol*. 2014;30(6):415–22.
58. Yoo JE, Kim MS, Kwon Y dae, Kim EC, Kim KC, Choi SC. Could zoledronic acid prevent root resorption in replanted rat molar? *Dent Traumatol*. 2015;31(6):465–70.
59. Nelson-Filho P, Rossi CRB, Gomes-Silva JM, Faraoni-Romano JJ, Lucisano MP, da Silva RAB, et al. Enamel permeability and resistance to acid challenges after systemic use of sodium alendronate: a study in rat teeth. *Clin Oral Investig* [Internet]. 2016;20(7):1647–54. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s00784-015-1647-5>
60. Najeeb S, Siddiqui F, Khurshid Z, Zohaib S, Zafar MS, Ansari SA. Effect of bisphosphonates on root resorption after tooth replantation – a systematic review. *Dent Traumatol*. 2017;33(2):77–83.
61. Paglioni M de P, Silva WG, Pereira J, Migliorati CA, Lopes MA, Almeida OP

- de, et al. Intravenous bisphosphonate therapy does not thicken cementum or change periodontal ligaments of cancer patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* [Internet]. 2017;123(5):591–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oooo.2017.02.008>
62. Vermeer JAF, Renders GAP, van Duin MA, Jansen IDC, Bakker LF, Kroon SA, et al. Bone-site-specific responses to zoledronic acid. *Oral Dis*. 2017;23(1):126–33.
 63. León Fernández OS, Ajamieh HH, Berlanga J, Menéndez S, Viebahn-Hánsler R, Re L, et al. Ozone oxidative preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in a rat model of liver ischemia/reperfusion. *Transpl Int*. 2008;21(1):39–48.
 64. Zandi M, Dehghan A, Malekzadeh H, Janbaz P, Ghadermazi K, Amini P. Introducing a protocol to create bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rat animal model. *J Cranio-Maxillofacial Surg* [Internet]. 2016;44(3):271–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2015.12.010>
 65. Dedavid BA, Gomes CI, Machado G. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras. 2007.
 66. Fujimura Y, Kitaura H, Yoshimatsu M, Eguchi T, Kohara H, Morita Y, et al. Influence of bisphosphonates on orthodontic tooth movement in mice. *Eur J Orthod*. 2009;31(6):572–7.
 67. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor κB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res*. 2002;17(2):210–20.
 68. Kozloff KM, Volakis LI, Marini JC, Caird MS. Near-infrared fluorescent probe traces bisphosphonate delivery and retention in vivo. *J Bone Miner Res*. 2010;25(8):1748–58.
 69. Patel S, Lambrechts P, Shemesh H, Mavridou A. European Society of Endodontology position statement: external cervical resorption. *Int Endod J*. 2018;51(12):1323–6.
 70. Mavridou AM, Bergmans L, Barendregt D, Lambrechts P. Descriptive analysis of factors associated with external cervical resorption. *J Endod* [Internet]. 2017;43(10):1602–10. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2017.05.026>
 71. Patel S, Mavridou AM, Lambrechts P, Saberi N. External cervical resorption - part 1: histopathology, distribution and presentation. *Int Endod J*. 2018;51(11):1205–23.
 72. Consolaro A. Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas. 3ª edição. Press D, organizador. Maringá; 2012. 816 p.
 73. Martins CA, Leyhausen G, Volk J, Geurtsen W. Effects of alendronate on osteoclast formation and activity in vitro. *J Endod* [Internet]. 2015;41(1):45–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2014.07.010>
 74. Correia VDFP, Caldeira CL, Marques MM. Cytotoxicity evaluation of sodium alendronate on cultured human periodontal ligament fibroblasts. *Dent Traumatol*. 2006;22(6):312–7.
 75. Naidu A, Dechow PC, Spears R, Wright JM, Kessler HP, Opperman LA. The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2008;106(1):5–13.
 76. García-Moreno C, Serrano S, Nacher M, Farré M, Díez A, Mariñoso ML, et al. Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts. *Bone*.

- 1998;22(3):233–9.
77. Pacheco VN, Langie R, Etges A, Ponzoni D, Puricelli E. Nitrogen-containing bisphosphonate therapy: Assessment of the alveolar bone structure in rats - a blind randomized controlled trial. *Int J Exp Pathol*. 2015;96(4):255–60.
 78. Shibata T, Komatsu K, Shimada A, Shimoda S, Oida S, Kawasaki K, et al. Effects of alendronate on restoration of biomechanical properties of periodontium in replanted rat molars. *J Periodontal Res*. 2004;39(6):405–14.
 79. Wesselink PR, Beertsen W. The influence of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP) on dental root resorption in the mouse. *Calcif Tissue Int*. 1989;45(2):104–10.
 80. Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ, Boyce, Roodman, et al. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res*. 2006;12(20 PART 2):6222–31.

7 PRESS RELEASE

Os bisfosfonatos são medicamentos usados na prevenção e no tratamento de doenças ósseas, como a osteoporose e as metástases ósseas associadas ao câncer. Apesar dos seus benefícios, com o crescente uso de bisfosfonatos, efeitos colaterais foram observados na região oral, como a osteonecrose dos ossos maxilares, atraso ou inibição da erupção dentária e malformações dos dentes. Uma vez que os bisfosfonatos comprovadamente afetam os ossos e os dentes, faz-se necessária uma investigação mais detalhada dos seus efeitos sobre as estruturas nele inseridas: as raízes dentárias. Analisando a topografia (superfície) do cimento, estrutura que recobre a superfície radicular dos dentes, após o tratamento com altas concentrações de bisfosfonatos, pode-se obter parte da resposta. Por esse motivo, o presente estudo teve o objetivo de observar os aspectos morfológicos radiculares de dentes molares de ratos submetidos a tratamento com bisfosfonato injetável (ácido zoledrônico) através de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Durante a análise, foram identificados: reabsorções rasas na superfície do cimento (perdas estruturais causadas por ação de outras células) na maioria dos grupos estudados; regiões craqueladas (aglomerados de trincas), em diferentes comprimentos e profundidades, nas superfícies radiculares de todos os grupos; e um cimento mais rugoso e volumoso nas porções mais próximas ao ápice radicular dentário (ponta da raiz) de todos os grupos. Entretanto, os dados obtidos não foram suficientes para se confirmarem os indícios de que a administração periódica de bisfosfonatos possa causar alterações morfológicas na topografia radicular de dentes molares de ratos, ao menos superficialmente. Assim, novas pesquisas são de grande importância para estabelecer definitivamente a segurança na utilização dos bisfosfonatos para as estruturas dentárias.

APÊNDICES

Quadro 1 – Peso (g) de cada animal, dose (ml) de Zometa administrada aos grupos ZOZ e ZST e dose (ml) de soro fisiológico administrado aos grupos COZ e CST nas quatro primeiras semanas. M = morte do rato por complicações; F = rato fêmea

	Rato	Dose 1 - 3/5		Dose 2 - 10/5		Dose 3 - 17/5		Dose 4 - 24/5	
		Peso (g)	Dose (ml)	Peso (g)	Dose (ml)	Peso (g)	Dose (ml)	Peso (g)	Dose (ml)
Z O Z	1	270	0,4455	290	0,4785	297	0,4901	310	0,5115
	2	325	0,5363	345	0,5693	351	0,5792	363	0,5990
	3	260	0,4290	272	0,4488	285	0,4703	298	0,4917
	4	288	0,4752	306	0,5049	317	0,5231	325	0,5363
	5	263	0,4340	280	0,4620	299	0,4934	315	0,5198
	6	258	0,4257	284	0,4686	302	0,4983	315	0,5198
	7	248	0,4092	270	0,4455	292	0,4818	305	0,5033
	8	225	0,3713	243	0,4010	260	0,4290	265	0,4373
	9	285	0,4703	296	0,4884	306	0,5049	M	M
	10	315	0,5198	330	0,5445	342	0,5643	344	0,5676
	11	264	0,4356	294	0,4851	307	0,5066	320	0,5280
Z S T	1	246	0,4059	258	0,4257	270	0,4455	275	0,4538
	2	270	0,4455	284	0,4686	300	0,4950	318	0,5247
	3	280	0,4620	298	0,4917	315	0,5198	315	0,5198
	4	266	0,4389	294	0,4851	310	0,5115	315	0,5198
	5	199	0,3284	199	0,3284	214	0,3531	F	F
	6	225	0,3713	242	0,3993	275	0,4538	F	F
	7	230	0,3795	247	0,4076	261	0,4307	273	0,4505
	8	234	0,3861	236	0,3894	255	0,4208	F	F
	9	198	0,3267	215	0,3548	228	0,3762	224	0,3696
	10	220	0,3630	225	0,3713	240	0,3960	F	F
	11	208	0,3432	225	0,3713	250	0,4125	252	0,4158
C O Z	1	230	0,3795	246	0,4059	254	0,4191	270	0,4455
	2	225	0,3713	248	0,4092	267	0,4406	285	0,4703
	3	237	0,3911	264	0,4356	282	0,4653	300	0,4950
	4	304	0,5016	330	0,5445	337	0,5561	350	0,5775
	5	228	0,3762	348	0,5742	261	0,4307	272	0,4488
	6	312	0,5148	331	0,5462	348	0,5742	359	0,5924
	7	317	0,5231	344	0,5676	362	0,5973	374	0,6171
	8	218	0,3597	238	0,3927	264	0,4356	273	0,4505
	9	220	0,3630	239	0,3944	250	0,4125	264	0,4356
	10	234	0,3861	255	0,4208	267	0,4406	279	0,4604
	11	197	0,3251	205	0,3383	197	0,3251	F	F
C S T	1	230	0,3795	245	0,4043	269	0,4439	276	0,4554
	2	221	0,3647	245	0,4043	270	0,4455	277	0,4571
	3	284	0,4686	308	0,5082	332	0,5478	345	0,5693
	4	224	0,3696	240	0,3960	256	0,4224	265	0,4373
	5	211	0,3482	229	0,3779	235	0,3878	243	0,4010
	6	235	0,3878	270	0,4455	292	0,4818	296	0,4884
	7	277	0,4571	308	0,5082	330	0,5445	342	0,5643
	8	238	0,3927	260	0,4290	285	0,4703	292	0,4818
	9	200	0,3300	202	0,3333	214	0,3531	215	0,3548
	10	190	0,3135	190	0,3135	198	0,3267	198	0,3267
	11	217	0,3581	218	0,3597	227	0,3746	226	0,3729

Quadro 2 – Peso (g) de cada animal, dose (ml) de Zometa administrada aos grupos ZOZ e ZST e dose (ml) de soro fisiológico administrado aos grupos COZ e CST nas quatro primeiras semanas. M = morte do rato por complicações; F = rato fêmea

	Rato	Dose 5 - 31/5		Dose 6 - 7/6		Dose 7 - 14/6		Dose 8 - 21/6	
		Peso (g)	Dose (ml)	Peso (g)	Dose (ml)	Peso (g)	Dose (ml)	Peso (g)	Dose (ml)
Z O Z	1	314	0,5181	322	0,5313	332	0,5478	349	0,5759
	2	372	0,6138	377	0,6221	385	0,6353	401	0,6617
	3	298	0,4917	315	0,5198	323	0,5330	319	0,5264
	4	308	0,5082	319	0,5264	337	0,5561	336	0,5544
	5	323	0,5330	338	0,5577	348	0,5742	362	0,5973
	6	322	0,5313	344	0,5676	361	0,5957	371	0,6122
	7	M	M	M	M	M	M	M	M
	8	277	0,4571	300	0,4950	303	0,5000	314	0,5181
	9	M	M	M	M	M	M	M	M
	10	348	0,5742	366	0,6039	370	0,6105	387	0,6386
	11	338	0,5577	349	0,5759	365	0,6023	380	0,6270
Z S T	1	272	0,4488	282	0,4653	288	0,4752	295	0,4868
	2	318	0,5247	331	0,5462	332	0,5478	332	0,5478
	3	333	0,5495	350	0,5775	360	0,5940	367	0,6056
	4	321	0,5297	329	0,5429	336	0,5544	337	0,5561
	5	F	F	F	F	F	F	F	F
	6	F	F	F	F	F	F	F	F
	7	286	0,4719	309	0,5099	312	0,5148	310	0,5115
	8	F	F	F	F	F	F	F	F
	9	233	0,3845	253	0,4175	363	0,5990	265	0,4373
	10	F	F	F	F	F	F	F	F
	11	274	0,4521	298	0,4917	300	0,4950	326	0,5379
C O Z	1	275	0,4538	299	0,4934	310	0,5115	321	0,5297
	2	295	0,4868	312	0,5148	323	0,5330	338	0,5577
	3	315	0,5198	335	0,5528	343	0,5660	364	0,6006
	4	363	0,5990	385	0,6353	397	0,6551	418	0,6897
	5	272	0,4488	293	0,4835	306	0,5049	309	0,5099
	6	355	0,5858	363	0,5990	372	0,6138	366	0,6039
	7	367	0,6056	380	0,6270	395	0,6518	397	0,6551
	8	185	0,3053		0,0017	M	M	M	M
	9	265	0,4373	283	0,4670	297	0,4901	307	0,5066
	10	277	0,4571	300	0,4950	319	0,5264	323	0,5330
	11	F	F	F	F	F	F	F	F
C S T	1	279	0,4604	303	0,5000	314	0,5181	334	0,5511
	2	280	0,4620	295	0,4868	321	0,5297	332	0,5478
	3	362	0,5973	377	0,6221	393	0,6485	403	0,6650
	4	265	0,4373	280	0,4620	294	0,4851	302	0,4983
	5	236	0,3894	251	0,4142	262	0,4323	260	0,4290
	6	306	0,5049	331	0,5462	344	0,5676	353	0,5825
	7	355	0,5858	383	0,6320	397	0,6551	408	0,6732
	8	295	0,4868	318	0,5247	327	0,5396	338	0,5577
	9	211	0,3482	218	0,3597	229	0,3779	230	0,3795
	10	198	0,3267	200	0,3300	208	0,3432	215	0,3548
	11	230	0,3795	238	0,3927	243	0,4010	234	0,3861

Quadro 3 – Peso (g) de cada animal, dose (ml) de Quetamina e Xilazina administradas aos grupos ZOZ, ZST, COZ e CST previamente às exodontias. M = morte do rato por complicações; F = rato fêmea

	Rato	Peso (g)	Quetamina (ml)	Xilazina (ml)
Z O Z	1	310	0,310	0,155
	2	363	0,363	0,182
	3	298	0,298	0,149
	4	325	0,325	0,163
	5	315	0,315	0,158
	6	315	0,315	0,158
	7	305	0,305	0,153
	8	265	0,265	0,133
	9	M	M	M
	10	344	0,344	0,172
	11	320	0,320	0,160
Z S T	1	275	0,275	0,138
	2	318	0,318	0,159
	3	315	0,315	0,158
	4	315	0,315	0,158
	5	F	F	F
	6	F	F	F
	7	273	0,273	0,137
	8	F	F	F
	9	224	0,224	0,112
	10	F	F	F
	11	252	0,252	0,126
C O Z	1	270	0,270	0,135
	2	285	0,285	0,143
	3	300	0,300	0,150
	4	350	0,350	0,175
	5	272	0,272	0,136
	6	359	0,359	0,180
	7	374	0,374	0,187
	8	273	0,273	0,137
	9	264	0,264	0,132
	10	279	0,279	0,140
	11	F	F	F
C S T	1	276	0,276	0,138
	2	277	0,277	0,139
	3	345	0,345	0,173
	4	265	0,265	0,133
	5	F	F	F
	6	296	0,296	0,148
	7	342	0,342	0,171
	8	292	0,292	0,146
	9	215	0,215	0,108
	10	198	0,198	0,099
	11	226	0,226	0,113

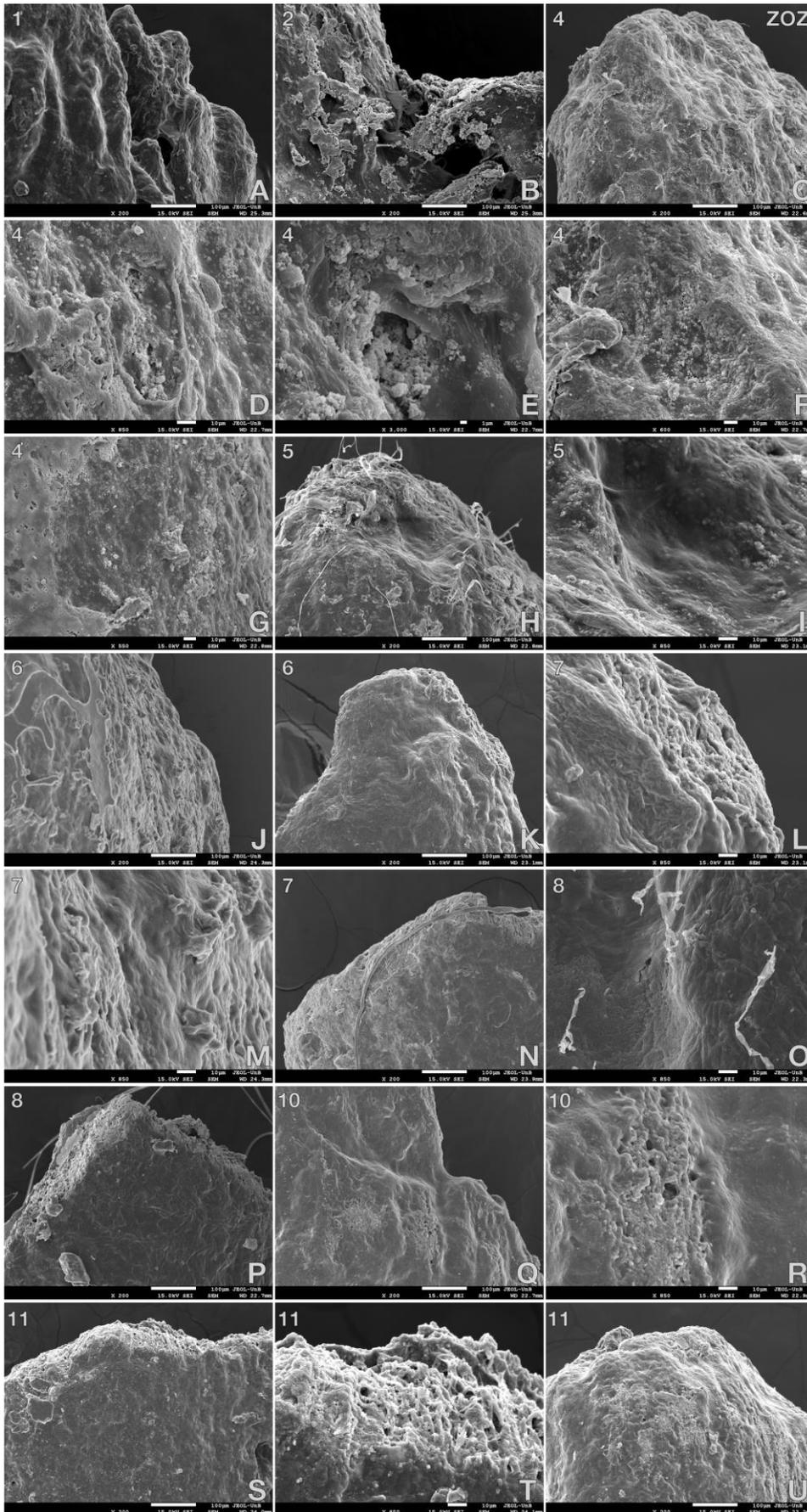


Figura 25 – Detalhes da topografia radicular dos dentes obtidos do grupo ZOZ. Aumentos: A, B, C, H, J, K, N, P, Q, S e U=200X; D, I, L, M, O, R e T=850X; E=3000X; F=600; G=550

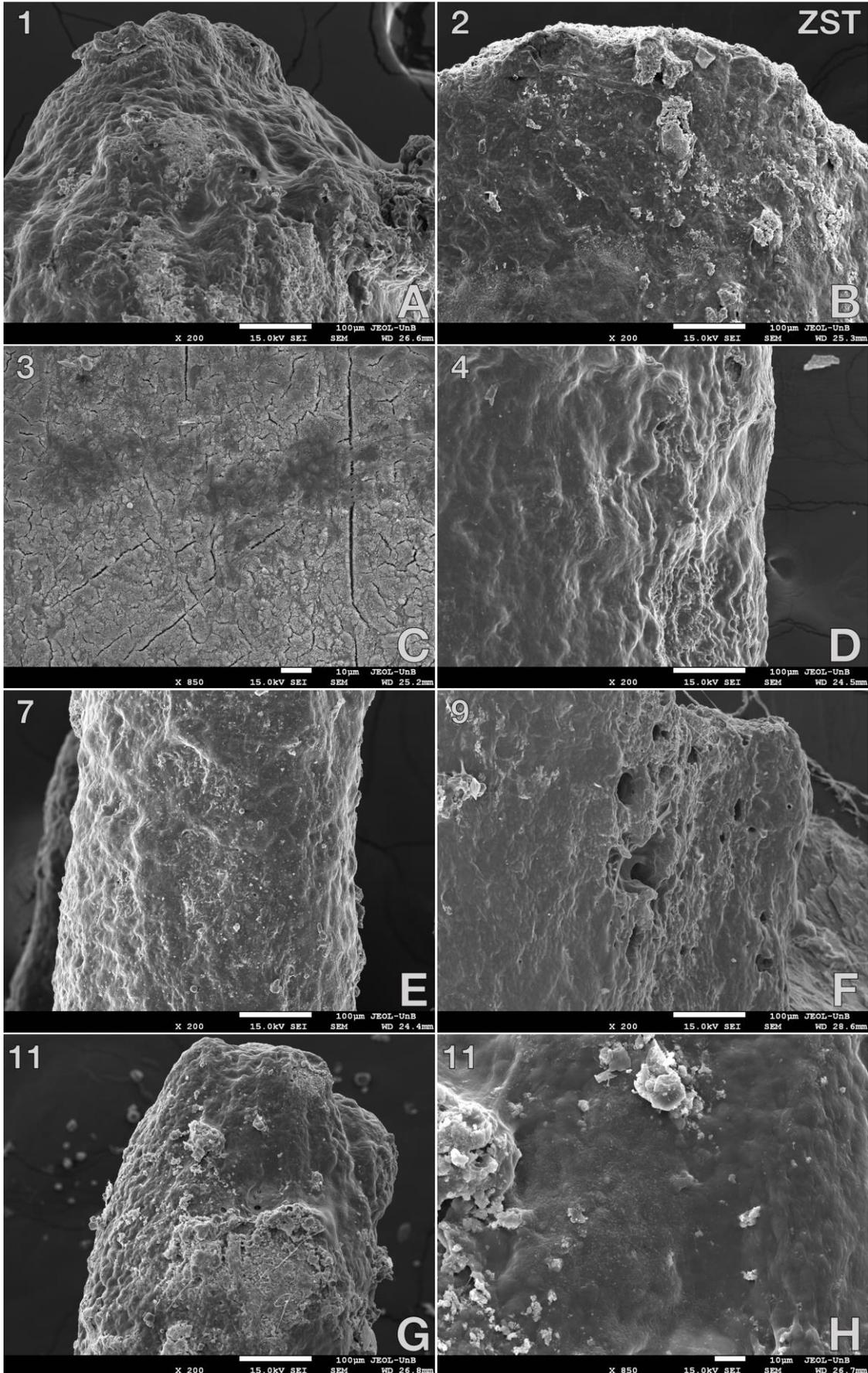


Figura 26 – Detalhes da topografia radicular dos dentes obtidos do grupo ZST. Aumentos: A, B, D, E, F e G=200X; C e H=850X

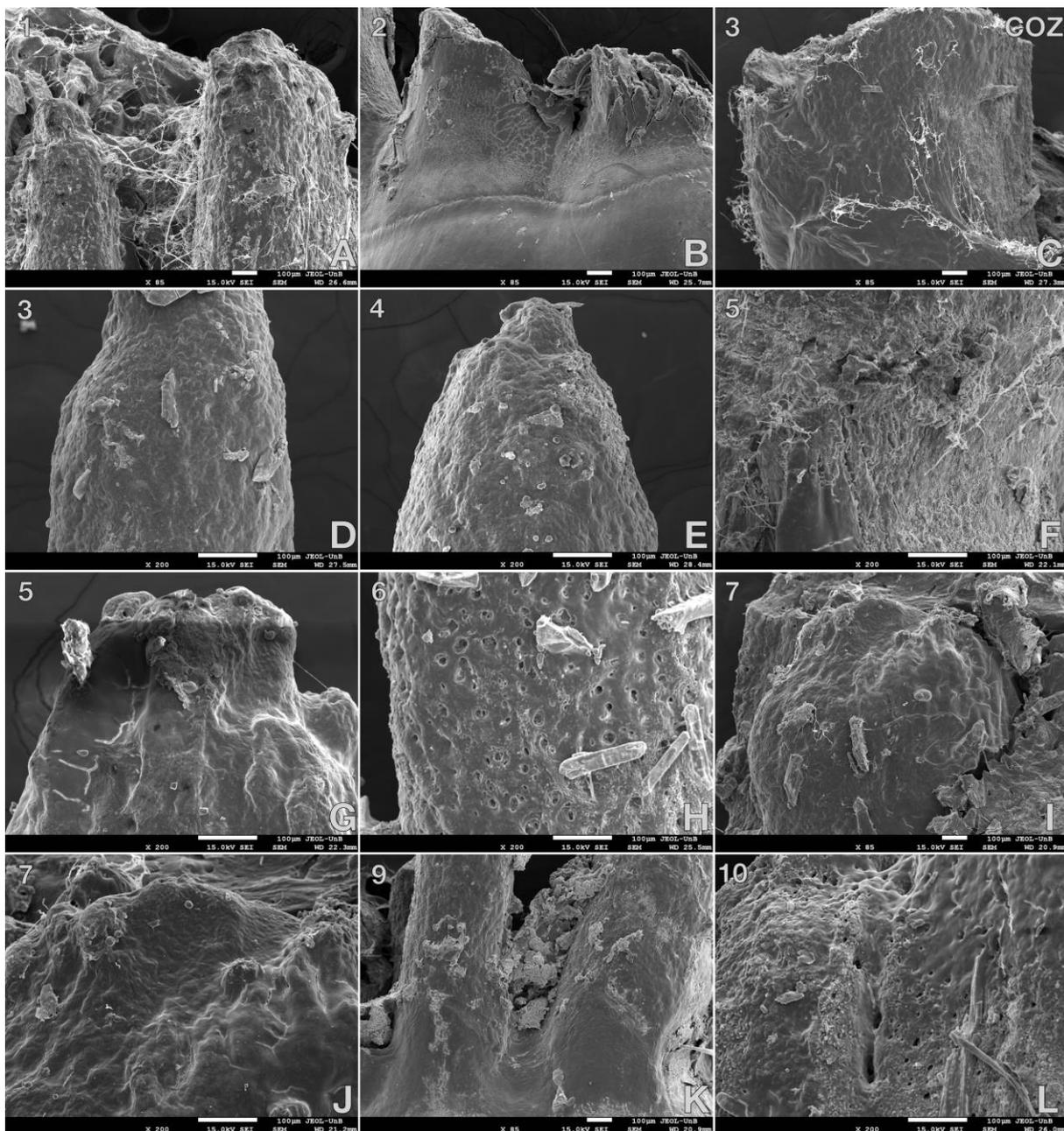


Figura 27 – Detalhes da topografia radicular dos dentes obtidos do grupo COZ. Aumentos: A, B, C, I e K=85X; D, E, F, G, H, J e L=200X

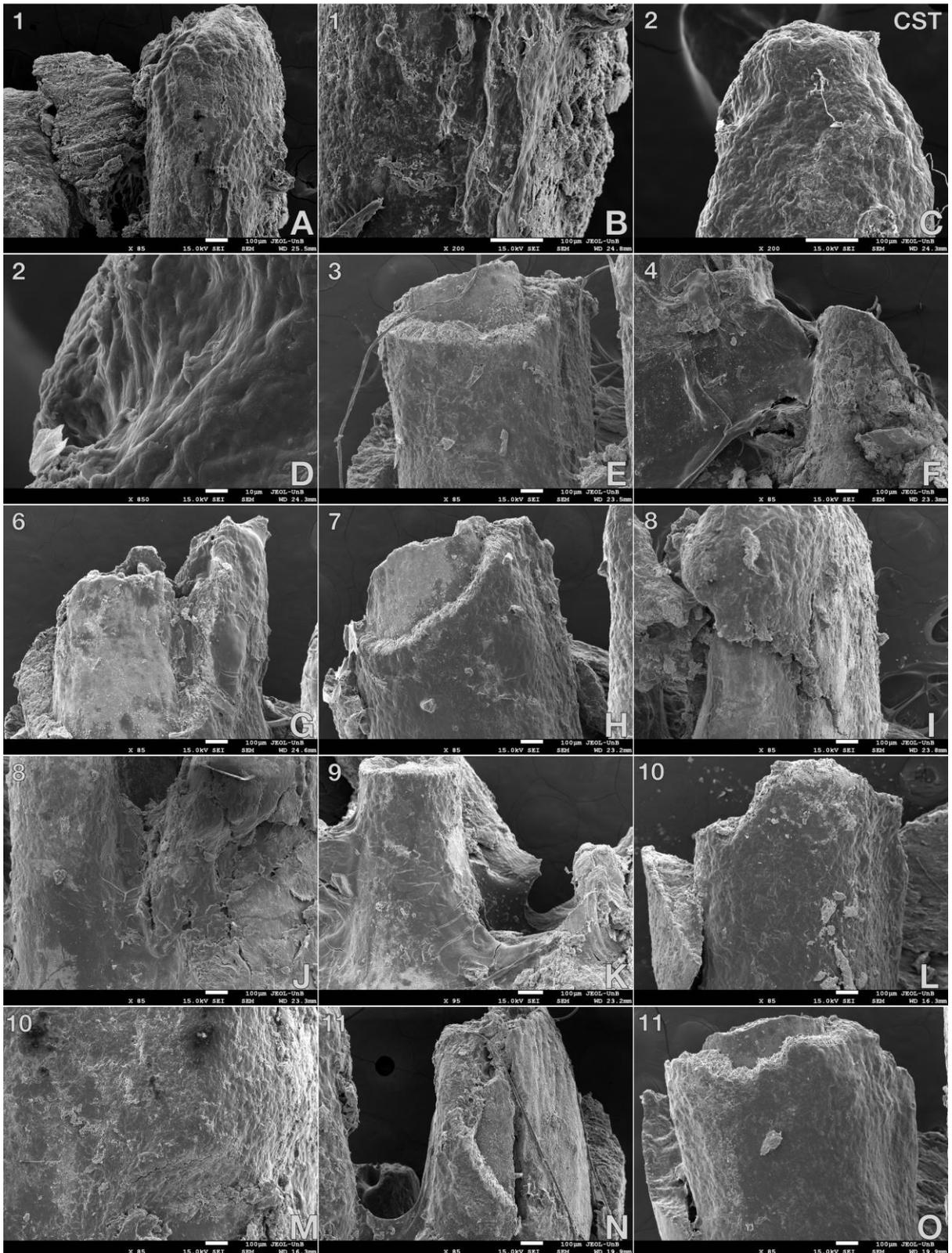


Figura 28 – Detalhes da topografia radicular dos dentes obtidos do grupo CST. Aumentos: A, E, F, G, H, I, J, L, M, N e O=85X; B e C=200X; D=850X; K=95X

ANEXOS

Anexo A – Documento de aprovação pelo Comitê de Ética



Universidade de Brasília

 Instituto de Ciências Biológicas

Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 2 de junho de 2017.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "ZOLEDRONATO X DENOSUMAB: AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DA ANÁLISE POR MICROTOMOGRAFIA E HISTOLÓGICA DAS ALTERAÇÕES ÓSSEAS EM MANDÍBULAS DE RATAS", Protocolo n.º 34/2017, sob responsabilidade do Professor Paulo Tadeu de Souza Figueiredo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Rattus norvegicus* (SI rémexs). A presente aprovação é válida pelo período de: 1º/06/2017 a 1º/06/2018.





 Prof. Dra. Paula Diniz Galera

 Coordenadora da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.