

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**Efeito do alendronato de sódio na cicatrização óssea alveolar
pós-extração dentária em coelhas osteoporóticas**

Nilo Guliberto Martins Chávarry, C.D., M.O.

**Tese apresentada à Faculdade
de Odontologia da
Universidade Federal do Rio de
Janeiro como parte dos
requisitos necessários para
obtenção do Grau de Doutor
em Odontologia (Periodontia).**

Rio de Janeiro

2017

**Efeito do alendronato de sódio na cicatrização óssea alveolar
pós-extração dentária em coelhas osteoporóticas**

Nilo Guliberto Martins Chávarry, C.D., M.O.

**Orientadores: Prof. Dr. Eduardo Jorge Feres Filho
Prof. Dr. Alberto Schanaider**

**Tese apresentada à Faculdade
de Odontologia da
Universidade Federal do Rio de
Janeiro, como parte dos
requisitos necessários para
obtenção do Grau de Doutor
em Odontologia (Periodontia).**

Rio de Janeiro

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Chávarry, Nilo Guliberto Martins

Efeito do alendronato de sódio na cicatrização óssea alveolar pós-extração dentária em coelhas osteoporóticas / Nilo Guliberto Martins Chávarry

Rio de Janeiro:UFRJ, 2017.

vxii,59f.13il. 31cm.

Orientadores: Eduardo Jorge Féres-Filho e Alberto Schanaider.

Tese (Doutorado Odontologia [Periodontia]) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia, 2017.

Referências: f 33 - 40.

1.Micro tomografia. 2. Alendronato. 3. Cross-link do colágeno. 4. Osteonecrose. 5. Densidade óssea. 6. HPLC. - Teses. I. Féres-Filho, Eduardo Jorge. Schanaider, Alberto. II. UFRJ, Faculdade de Odontologia, Pós-graduação em Odontologia (Periodontia). III Efeito do alendronato de sódio na cicatrização óssea alveolar pós-extração dentária em coelhas osteoporóticas

FOLHA DE APROVAÇÃO

CHÁVARRY, Nilo Guliberto Martins. Efeito do alendronato de sódio na cicatrização óssea alveolar pós-extração dentária em coelhas osteoporóticas

PROFESSORES ORIENTADORES

Eduardo Jorge Feres Filho

Professor Titular do Departamento de Clínica Odontológica (Periodontia) da UFRJ

Alberto Schanaider

Professor Titular do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFRJ

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA FOUFRJ

Professora Doutora Laura Salignac de Souza Guimarães Primo

Ao meu pai (póstumo) e minha mãe que me ensinaram o real sentido da vida, amar à si próprio e ao próximo.

Dedico

AGRADECIMENTO

Agradeço à Deus em primeiro lugar.

À minha esposa Gabriela, aos meus filhos Iago e Nina que são minha fonte de energia.

Às minhas irmãs Nilene e Malena que completam minha existência.

Aos meus orientadores professor Eduardo Féres e Alberto Schanaider pelos seus ensinamentos.

Ao professor José Eduardo Ferreira Manso por me transmitir o conhecimento de forma clara e tranquila.

À professora Anna Teresa Leão pelos conselhos e alertas.

Ao professor Carmelo Sansone pelos comentários oportunos, sobretudo nos seminários.

Ao professor Márcio Saião (póstumo) pelas suas palavras de motivação e incentivo.

Ao professor Paulo César Silva pelo apoio diário na cirurgia experimental e seu otimismo inabalável.

Ao professor Manoel Luiz Ferreira pelas inúmeras aulas particulares que me deu no biotério.

Ao professor Wagner Baetas pelos seus conselhos na prática experimental.

Ao professor Daniel Perrone pela parceria no projeto.

Ao Bernardo Camargo pelas aquisições na micro tomografia.

À professora Maria Lucia Fleuiss pela dedicação e carinho com que me orientou.

À funcionária Eliete que me ajudou a cuidar dos animais no biotério.

À minha secretária Edilaine e seu esposo James, que não mediram esforços para me ajudar.

À tia Arlene (póstumo), sempre amável e preocupada comigo.

À Angelina (póstumo) pelo seu profissionalismo e carinho comigo.

À Rosinha, Simone, Kátia, Cristiane e Norma, verdadeiras amigas no dia a dia da clínica.

Ao Beto, sempre pronto a ajudar.

Ao sr. Lucindo que sempre tem um sorriso para dar.

Aos meus alunos dedicados e responsáveis de iniciação científica, Pedro, Luiza, Nayara, Fernanda e Filipe pela ajuda nas cirurgias e gavagens.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMO	x
SUMMARY	xi
RÉSUMÉ	xii
INTRODUÇÃO	2
OBJETIVO	7
MATERIAL E MÉTODOS	8
RESULTADOS	19
DISCUSSÃO	26
CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33
ANEXOS	41

LISTA DE ABREVIATURAS

μ CT: Micro tomografia computadorizada
 μ T: Microtomógrafo
AGE: Advanced glycation end products
AL: Alendronato
BFS: Bisfosfonatos
BL: Baseline
BTCa: Baixo teor de cálcio
BV: Bone volume
CCS: Centro ciências da saúde
CECAL: Centro de criação de animais de laboratório
CEUA: Comitê de ética em pesquisa com animais
DEXA: Densitômetro de dupla energia de absorciometria de raio X
DF: Dimensão Fractal
DO: Densitometria óssea
DT: Dose total
FioCruz: Fundação Oswaldo Cruz
HCL: Ácido clorídrico
HFBA: Anidrido heptafluorobutírico
HPLC: High Performance liquid chromatography
INT STD: Padrão interno
K: Constante K
KCal: quilocalorias
M: Massa
N: Número
ONB: Osteonecrose dos maxilares por bisfosfonatos
OV: Ovariectomia
OV+AL: Ovariectomia mais alendronato

OV+PL: Ovariectomia mais placebo
PEN: Pentosidina
PPD: Deoxipiridinolina
PTH: Paratormônio
PYD: Piridinolina
ROI: Região de interesse
SH+PL: Sham mais placebo
SPSS: Statistical Package for the Social Sciences
TC: Tomografia Computadorizada
TMB: Taxa metabólica basal
TME: Taxa metabólica específica
VOI: Volume de interesse
#14: Dente primeiro premolar superior direito
#24: Dente primeiro premolar superior esquerdo
#34: Dente primeiro premolar inferior esquerdo
#44: Dente primeiro premolar inferior direito

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	21
Figura 2.....	30
Figura 3.....	31
Figura 4.....	32
Figura 5.....	33
Figura 6.....	34
Figura 7.....	35

RESUMO

Objetivo: Tem sido mostrado que o aminobisfosfonato oral alendronato de sódio (AL) reduz o risco de fraturas em mulheres osteoporóticas, mas o efeito desta terapia nos ossos maxilares ainda é controverso. O objetivo foi testar a hipótese de que a terapia anti-osteoporótica com AL afeta a qualidade do osso alveolar neoformado após extração dentária, em especial o padrão de reticulação do colágeno tipo I. Métodos: Osteoporose foi induzida por ovariectomia (OV) em coelhas com 6 meses de idade (*Oryctolagus cuniculus*). Seis semanas após a cirurgia, oito animais foram tratados por gavagem com AL (OV+AL) e dez receberam placebo (OV+PL). Seis coelhas que foram submetidas a operação de simulação (SH) também receberam placebo (SH+PL). Um mês após o início do tratamento, os dentes #34 e #24 foram removidos. Seis semanas mais tarde, os dentes #14 e #44 foram extraídos. Um mês após a segunda extração, biópsias foram coletadas com uma trefina dos sítios em reparo do dente #34 (cicatrização inicial) e do #14 (cicatrização tardia) e submetidas a cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação do "crosslink" pentosidina. Parte das biópsias foram submetidas a quantificação do colágeno tipo I por espectrofotometria. Nesse mesmo tempo, segmentos ósseos mandibulares bilaterais, englobando os sítios de extração dos dentes #34 e #44 foram submetidos a microtomografia computadorizada para comparação de volume ósseo entre os grupos. Valores médios foram comparados com ANOVA para medidas repetidas, seguida de teste post-hoc de Tukey. Resultados: Animais tratados com AL alcançaram o maior volume médio de osso neoformado no período de cicatrização tardia (2 vezes OV+PL, $p<0,05$). Colágeno se acumulou mais no grupo OV+AL em comparação com os grupos controle, tanto na fase inicial quanto na tardia de cicatrização (2-4 vezes, $p<0,05$). Entretanto, os animais dos grupos OV+PL e OV+AL apresentaram quantidades maiores de pentosidina do que os do grupo SH+PL ($p<0,05$). Conclusão: A terapia anti-osteoporótica com alendronato de sódio proporciona aumento no volume ósseo e no acúmulo de colágeno tipo I, mas não resgata totalmente a qualidade do tecido alveolar não-osteoporótico, evidenciado pela quantidade aumentada de reticulação colágena não-enzimática.

Palavras chave: osteoporose, coelhas, bisfosfonatos, colágeno tipo I, reticulação, HPLC

SUMMARY

Objective: It has been shown that the oral aminobisphosphonate sodium alendronate (AL) reduces the risk of main fractures in osteoporotic women, but the effects of this therapy on the jaw bones is still controversial. Our goal was to test the hypothesis that the anti-osteoporotic therapy with AL affects the quality of the post-extraction neoformed alveolar bone, particularly type I collagen crosslinking. Methods: Osteoporosis was induced by ovariectomy (OV) in 6-month old white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Six weeks following surgery, eight animals were treated by oral gavage with AL (OV+AL) and ten received placebo (OV+PL). Six rabbits which were sham operated (SH) also received placebo (SH+PL). One month following the beginning of treatment, teeth #34 and #24 were removed. Six weeks later, teeth #14 and #44 were also extracted. One month after the second extraction procedure biopsies were collected with a trephine from the extraction sites of teeth #34 (initial healing) and #14 (late healing), and subjected to High Performance Liquid Chromatography for the quantification of crosslink pentosidine and to spectrophotometer for quantification of type I collagen. Also at this time, bilateral bone segments of the mandible, encompassing the extraction sites of teeth #34 and #44, were subjected to microComputed Tomography for the comparison of bone volume among groups. Mean values were compared with one-way repeated measures ANOVA followed by post-hoc Tukey's test. Results: Animals treated with AL achieved the greatest mean volume of new formed bone at the late healing period (2-times OV+PL, $p<0.05$). Collagen accumulated significantly more in the OX+AL group compared with the control groups, at both initial and late healing phase (2-4-times, $p<0.05$). However, OV+PL and OV+AL animals presented higher amounts of the crosslink pentosidine than the SH+PL group ($p<0.05$). Conclusion: Anti-osteoporotic therapy with sodium alendronate increases bone volume and type I collagen accumulation, but does not fully rescue the non-osteoporotic alveolar tissue quality as is evident from the increased quantity of non-enzymatic collagen crosslink.

Key words: osteoporosis, rabbits, bisphosphonate, type I collagen, cross-link, HPLC

RÉSUMÉ

Objectif : Il a été démontré que l'aminobisphosphonate oral Alendronate de sodium (AL) réduit le risque de fracture chez les femmes atteintes d'Ostéoporose, mais l'effet de ce traitement sur les maxillaires est encore controversé. Notre objectif a été de tester l'hypothèse selon laquelle le traitement anti-ostéoporotique par Alendronate de sodium affecte la qualité du nouvel os alvéolaire post-extraction dentaire, et en particulier de la formation du collagène de type I. **Méthodes:** L'Ostéoporose fut induite par ovariectomie (OV) sur des lapines de six mois (*Oryctolagus cuniculus*). Six semaines après l'opération, huit animaux ont été traités par gavage à l'Alendronate de sodium (OV+AL), et dix ont reçu le placebo (OV+PL). Six lapines qui ont été soumises à une opération de simulation (SH) ont aussi reçu le placebo (SH+PL). Un mois après le début du traitement, les dents #34 et #24 furent enlevées. Six semaines plus tard, les dents #14 et #44 furent extraites. Un mois après la deuxième extraction, des biopsies furent réalisées par trépano ponction sur les zones d'extraction de la dent #34 (cicatrisation initiale) et de la dent #14 (cicatrisation finale), et soumises à une chromatographie en phase liquide à haute performance pour quantifier les liaisons croisées de la pentosidine. Elles ont aussi permis de quantifier le collagène de type I par spectrophotométrie. En outre, à ce moment-là, des segments osseux bilatéraux de la mandibule, englobant les sites d'extraction des dents #34 et #44, ont été soumis à une micro-tomographie pour la comparaison du volume osseux chez les groupes. Les moyennes ont été comparées à l'ANOVA à répétition à sens unique suivie d'un test post-hoc de Tukey. **Résultats:** Les animaux traités avec AL ont atteint le plus grand volume moyen de nouvel os formé à la période de cicatrisation tardive (2 fois OV+PL, $p < 0,05$). Le collagène s'est considérablement accumulé dans le groupe OV + AL par rapport aux groupes témoins, à la phase de guérison initiale et tardive (2-4 fois, $p < 0,05$). Cependant, les animaux OV+PL et OV+AL présentaient des quantités plus élevées de la pentosidine par liaison croisée que le groupe SH+PL ($p < 0,05$). **Conclusion:** la thérapie anti-ostéoporotique avec l'alendronate de sodium augmente le volume osseux et l'accumulation de collagène de type I, mais ne récupère pas complètement la qualité des tissus alvéolaires non ostéoporotiques, comme le montre la quantité accrue de liaison croisée non-enzymatique de collagène.

Mots clés: ostéoporose, lapins, bisphosphonate, collagène de type I, réticulation, HPLC

INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença esquelética sistêmica, complexa e multifatorial, caracterizada pela redução da massa óssea e degeneração da sua microarquitetura. Isso resulta em fragilidade do osso, elevando o risco de fraturas (WHO 1994). Além da morbidade que pode ser grave, principalmente na faixa dos maiores de 65 anos de idade, pacientes osteoporóticos com fratura de quadril, a maioria homens, têm três vezes mais chance de morrer no primeiro ano após o diagnóstico do que a população em geral (Klop et al., 2017; Kannegaard et al., 2010). A insuficiência de estrogênio provocada pela menopausa é o principal fator que desencadeia a perda óssea nas mulheres (Sowers et al., 1998; Manolagas et al., 2013). A partir da quarta década de vida, ambos os sexos vão apresentar perda progressiva de massa óssea que pode comprometer até 50% da massa óssea máxima por volta dos 80 anos de idade (Mazess 1982). O diagnóstico da osteoporose tem como base a densidade mineral óssea igual ou menor que 2,5 desvios-padrão da densidade mineral óssea de um adulto jovem (“T score”). Abaixo dessa densidade mineral, o risco de fratura óssea não traumática aumenta de forma não linear (WHO, 1994).

Não existe uma correlação definida entre a baixa densidade mineral óssea detectada nos ossos do esqueleto humano que são usados como diagnóstico para osteoporose (coluna vertebral, quadril, punho e fêmur) e a dos ossos maxilares (Calciolari et al., 2016). Estudos em animais ovariectomizados, estrogênio deficientes, não conseguiram estabelecer claramente um valor de densitometria para quantificar o risco aumentado de fratura dos ossos maxilares (Kuroda et al., 2003). Por outro lado, estudos nesse mesmo modelo experimental demonstraram, no alvéolo em reparação após extração dentária, uma diminuição da densidade

e do volume do osso neoformado, além da deterioração de sua microarquitetura (Tanaka et al., 2002; Jee et al., 2010).

O processo de cicatrização do alvéolo dentário tem sido estudado em diversos modelos animais e compreende uma série de eventos tais como formação e maturação de coágulo sanguíneo, infiltração de células fibroblásticas para substituição do coágulo por uma matriz conjuntiva provisória, mineralização da matriz osteóide e formação do osso maduro (Cardaropoli et al., 2003). Tanto no homem como em animais, esse processo pode ser dividido em três fases sequenciais que, muitas vezes, se sobrepõem: 1) inflamatória - células inflamatórias e fibroblastos imaturos invadem o coágulo e formam um tecido de granulação; 2) proliferativa - o tecido de granulação é parcialmente substituído por uma matriz conjuntiva provisória rica em fibras colágenas e células fibroblásticas que vai sendo invadida por vasos sanguíneos e células osteoblásticas e substituída por tecido osteóide; e 3) modelamento/remodelamento ósseo - o tecido ósseo imaturo (“woven bone”), com capacidade baixa de resistência a forças mecânicas, sob ação de osteoclastos, é reabsorvido e substituído gradualmente por osso lamelar maduro e medula óssea. No alvéolo de cães, esse processo ocorre em velocidade três a cinco vezes superior ao do homem, apesar da similaridade entre ambos. Em alvéolo humano, o preenchimento completo e a maturação do osso neoformado pode levar de vários meses a um ano, dependendo de diferenças biológicas entre indivíduos, tamanho do alvéolo e extensão do trauma cirúrgico durante a extração dentária (Araújo et al., 2015). Já, em coelhos, na 8^a semana de cicatrização, o alvéolo dentário atinge o máximo de formação de tecido ósseo mineralizado primário ou imaturo. Após esse período, começa a fase de remodelamento, sendo que o tecido ósseo atinge sua maturidade e adquire maior resistência mecânica na 16^a semana (Young et al., 2008).

Diversas características anatômicas e moleculares conferem propriedades mecânicas estruturais ao osso. O tecido ósseo é dividido em osso cortical ou compacto e osso medular ou esponjoso. O osso cortical apresenta uma microarquitetura cuja unidade básica é o osteon ou sistema Haversiano. O osteon consiste de lamelas concêntricas de matriz óssea arranjadas ao redor de canais Haversianos que, por sua vez, são interligados por canais de Volkmann. Já o osso medular é rico em traves e espaços medulares. Essas características anatômicas variam de acordo com a espécie animal. A espessura média do osso cortical localizado na região do colo femoral de mulheres pós-menopausa é aproximadamente dez vezes maior do que a de ratas e coelhas ovariectomizadas (Bagi et al., 1997; Sevil & Kara, 2010). Entretanto, o osso cortical ocupa 72.5% da área total de osso no fêmur de rato, enquanto em humanos ocupa apenas 12.5% (Bagi et al., 1996; 1997). Já, o tecido medular ocupa uma parte maior do que o osso cortical no fêmur humano em comparação com coelhos e ratos (Pazzaglia et al., 2007). A abundância de osso medular se deve a resposta específica a demandas mecânicas durante o movimento de locomoção (Martens et al., 1983).

A matriz orgânica também contribui para as propriedades mecânicas do osso. Como exemplo, condições tais como osteoporose/fratura ligada ao envelhecimento e patologias, incluindo diabetes mellitus e osteogênese imperfeita, estão associadas com alterações no perfil de reticulação (“crosslinking”) do colágeno tipo I. De fato, parece existir uma estreita associação entre o padrão reticular da matriz colágena e o processo de mineralização desta. No entanto, detalhes de como a quantidade, o tipo e a maturidade do “cross-link” afetam a qualidade do osso não são bem entendidos. Em situação de homeostasia, as moléculas de pró-colágeno são depositadas no espaço extracelular por osteoblastos e sofrem ação de peptidases que as transformam em moléculas de tropocolágeno. Estas, por sua vez, se auto-agregam

espontaneamente em fibrilas que, sob ação da enzima lisil oxidase, vão se estabilizar através de ligações cruzadas intermoleculares. Essas ligações cruzadas são do tipo covalente e se formam em telopeptídeo específico de lisina ou hidroxilisina nas cadeias de colágeno. “Crosslinks” divalentes, imaturos/reduzíveis (dehidro-dihidroxilisnonorleucina, dehidro-hidroxilisnonorleucina, dehidro-lisnonorleucina), amadurecem para formas trivalentes não-reduzíveis (piridinolina e deoxipiridinolina), também por processo espontâneo (Knott & Bailey, 1998). De qualquer modo, o osso mantém níveis elevados de ligações cruzadas imaturas, mesmo tendo envelhecido e perdido suas qualidades de resistência mecânica a fraturas (Banse et al., 2002). Além da reticulação enzimática, um outro tipo de reticulação do colágeno ocorre de maneira não-enzimática através de um processo final de glicação avançada (AGE), resultando em tecido amadurecido. O “AGE” mais frequentemente descrito é a pentosidina encontrada na reticulação glicada. Em contraste com os efeitos positivos gerados pela reticulação enzimática imatura, as ligações intermoleculares não enzimáticas têm efeitos deletérios sobre as funções mecânicas e biológicas do osso. O acúmulo de pentosidina, por exemplo, torna as fibras colágenas friáveis (Wang et al., 2002). Diabéticos, por apresentarem níveis elevados de glicose no soro e nos tecidos, têm quantidades aumentadas de reticulação rica em pentosidina que, por sua vez, correlacionam-se com fragilidade óssea (Bailey et al., 1998). Com o avanço da idade e a consequente osteoporose, a concentração de pentosidina aumenta da mesma forma, o que é considerado um fator importante tanto na redução da integridade estrutural do osso quanto na inibição da diferenciação e da função osteoclástica (Valcourt et al., 2007).

Por muitos anos a principal abordagem farmacológica para tratamento da osteoporose e da fragilidade óssea associada tem sido a utilização de agentes anti-reabsortivos. Além

desta, outras estratégias terapêuticas incluem reposição hormonal de estrogênio e medicações específicas como raloxifeno que modula seletivamente os receptores de estrogênio; hormônio da paratireóide (PTH) que age indiretamente mantendo o nível de cálcio extracelular; anticorpo monoclonal humano IgG2 que inibe a reabsorção óssea através de ligação com o Rank-L (mediador de diferenciação e função dos osteoclastos); calcitonina que é um hormônio produzido pela tireóide e inibe a reabsorção óssea. Recentemente, drogas com atividade anabólica sobre o tecido ósseo aumentaram o leque de opções anti-osteoporóticas, incluindo a teriparatida (forma recombinante do PTH) e o ranelato de estrôncio (Deeks & Dhillon, 2010). A maioria dos regimes farmacológicos recomenda, ainda, como parte da terapia básica, a suplementação de cálcio e vitamina D para se atingir níveis diários dos mesmos de 1000 mg e 800 UI, respectivamente (Leslie et al., 2012).

Dentre os agentes anti-reabsortivos, os bisfosfonatos (BFs) têm sido a primeira escolha para o tratamento farmacológico da osteoporose, baseado na eficácia clínica e nos custos (Fleurence et al., 2007). Estes agentes podem diminuir em até 30% a incidência de fraturas e em 60% a taxa de mortalidade associada a fratura de quadril (Beaupre et al., 2011; Ghirardi et al., 2014). Seu efeito na remodelagem óssea baseia-se na capacidade que os bisfosfonatos têm em diminuir atividade dos osteoclastos, em inibir a diferenciação de suas células progenitoras, em reduzir seu recrutamento para o tecido ósseo e, também, em abreviar sua sobrevivência pela indução à apoptose (Gossiel et al., 2016). Os BFs são divididos pela presença ou não do grupo amina (-NH₂). Os amino bisfosfonatos (alendronato, ibandronato, risedronato, pamidronato e zoledronato) são mais modernos e potentes do que os bisfosfonatos não aminados (etidronato e tiludronato). Sua estrutura molecular confere uma alta capacidade de ligação com íons metálicos divalentes, como o cálcio (Ca²⁺). No entanto,

apenas 1% da dose ingerida é absorvido pelo organismo e metade disso é excretada pelos rins. O restante, 0,5% se fixa na matriz óssea. Uma vez incorporados na matriz, sua meia vida pode atingir vários anos (Khan et al., 1997). Alguns pacientes são incapazes de tolerar a ingestão destes fármacos, devido a problemas gastrointestinais (Anastgasilakis et al., 2007). Ulcerações no esôfago tem sido reportadas em ensaios clínicos com bisfosfonatos por via oral (Ueda et al., 2011). Reação de fase aguda (febre, mialgia, artralgia, dores de cabeça e sintomas da gripe) também tem sido relacionada com o uso de bifosfonatos orais e intravenosos (Rizzoli et al., 2011). A hipocalcemia é outro efeito adverso do uso intravenoso dos bisfosfonatos (Kreutle et al., 2014; Kaur et al., 2016). A redução do aporte sanguíneo nos maxilares, em consequência ao emprego de BFs, pode resultar em necrose avascular do tecido ósseo. Essa condição, conhecida como osteonecrose dos maxilares associado ao uso dos bisfosfonatos (ONB), é um dos efeitos colaterais de maior importância clínica, já que até o momento nenhum tratamento ideal foi proposto para a ONB (Marx 2003; Patel et al., 2011; Urade et al., 2011; Khan et al., 2011). Mais recentemente, tem-se associado o uso prolongado de BFs a um aumento na incidência de fraturas atípicas do fêmur que pode ser explicado pela não remodelagem do tecido ósseo (Shane et al., 2014; Miller & McCarthy, 2015). A ação dos BFs sobre a qualidade das ligações cruzadas intermoleculares da matriz extracelular óssea, especialmente no aumento de pentosidina induzida por glicação avançada, poderia contribuir para fragilidade do osso (Shiraki et al., 2008). Entretanto, os efeitos moleculares dos BFs nos ossos maxilares são pouco conhecidos, especialmente naquele neoformado após extração dentária.

OBJETIVO

Testar a hipótese de que a terapia anti-osteoporótica com alendronato de sódio afeta a qualidade do osso alveolar neoformado após extração dentária, em especial o padrão de reticulação do colágeno tipo I.

MATERIAL E MÉTODOS

Modelo Animal Experimental

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com animais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CEUA) sob o número 007/15 (Anexo 1). Foram utilizadas 25 coelhas da espécie *Oryctolagus cuniculus*, subespécie Nova Zelândia, esqueleticamente amadurecidas, com 6 meses de idade, pesando em média 4 kg. Os animais, fornecidos pela Fundação Oswaldo Cruz (FioCruz), via Centro de criação de animais de laboratório (Cecal), foram identificados e distribuídos aleatoriamente, através de lançamento de dados, em três grupos. Grupo 1 (8 animais): Simulação cirúrgica da ovariectomia (“Sham”, SH) + Placebo (SH+PL), Grupo 2 (9 animais): Ovariectomia + Placebo (OV+ PL), Grupo 3 (8 animais): OV + Alendronato (OV+AL). Os animais, numerados de 1 a 25, foram alojados em gaiolas individuais no biotério do Centro de Cirurgia Experimental, do Departamento de Cirurgia, da Faculdade de Medicina da UFRJ no Centro de Ciências da Saúde (CCS). Os animais foram aclimatados por uma semana antes do início dos procedimentos, sendo mantidos em condições ambientais controladas, com temperatura entre 20 e 25 graus Celsius, umidade entre 30 e 35 % e luminosidade em ciclo circadiano (12 h claro/12 h escuro). A alimentação foi feita com ração da empresa Algomix Agroindustrial Ltda (Ouro Verde do Oeste, PR, Brasil) e água *ad libitum*.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia geral com Xilazina (Calcium 2%, 10 mL, Agener União, São Paulo, SP, Brasil) na dose 5mg/kg e Ketamina (Dopalen 10 mL, Ceva Saúde Animal Ltda, Paulínia, SP, Brasil), 35 mg/kg, ambos por via intramuscular. A seguinte sequência de procedimentos foi feita de acordo com os grupos

experimentais (Figura 1): no grupo SH+PL foram realizadas as cirurgias de simulação de ovariectomia, de extração dentária e ingestão de placebo (água destilada); no grupo OV+PL foram realizadas as cirurgias de ovariectomia, de extração dentária e ingestão de placebo; e no grupo OV+AL, foram realizadas as cirurgias de ovariectomia, de extração dentária e ingestão de alendronato. Após uma semana de aclimatação no biotério, todos os animais foram levados ao Hospital Clementino Fraga Filho, 7º andar, para realização de densitometria óssea. A densitometria óssea (DO) foi realizada em 3 tempos diferentes de acordo com a fase da pesquisa e o grupo: 1ª DO (antes da ovariectomia), 2ª DO (1 mês e meio após a ovariectomia), 3ª DO (na semana anterior do dia da indução ao óbito). Foi usado o densitômetro de dupla energia de absorciometria de raio X (DEXA; Lunar Prodigy Advanced plus, GE Lunar, Milwaukee, WI, USA), com fonte de potencial constante de 76 kV, filtro K-edge dose eficiente e corrente do tubo de 0,05-1,50 mA e tubo detector NaI PM com alta frequência de pulso. Os animais foram posicionados na mesa em decúbito ventral sob anestesia geral com Ketamina e Xilazina, após serem pesados. Todos os exames densitométricos foram realizados em duplicata. Após a realização do primeiro exame, foi feita a retirada do animal da mesa operadora e em seguida o mesmo foi reposicionado para realização do segundo exame. O operador capturou as imagens, utilizando o modo de varredura padrão 1.8 µGy do programa Lunar Prodigy Advance (GE HealthCare, Chicago, IL, EUA), específico para pequenos animais, instalado em um computador conectado ao densitômetro. Este programa permitiu a análise da densidade mineral óssea de corpo inteiro em g/cm². Todos os exames foram realizados pelo mesmo operador, experiente na técnica, no mesmo densitômetro e sem ter conhecimento sobre qual grupo os animais pertenciam. Após os exames os animais eram levados de volta ao biotério para suas respectivas gaiolas.

Uma semana após a realização da primeira densitometria, os animais foram submetidos a cirurgia de ovariectomia (grupo 2 e 3) ou a simulação de ovariectomia (grupo 1). Para tal, foi realizada raspagem dos pelos seguida da lavagem com solução de iodopovidona na região ventral dos animais antes de posicioná-los em decúbito dorsal na mesa cirúrgica. Para remoção bilateral dos ovários foi executada uma incisão ventral na linha média de aproximadamente 10 cm, no nível da vértebra lombar, seguida da dissecação das camadas laterais musculares do abdômen para se ter acesso aos ovários. Os ligamentos ovarianos e a trompa de falópio foram suturados para evitar hemorragia e trauma durante e após a exérese dos ovários. No Grupo SH+PL os ovários foram manipulados, levantados e colocados na sua posição original (Cao et al., 2001). A cobertura antibiótica e a medicação anti-inflamatória/analgésica pós-operatória foram feitas para todos os procedimentos cirúrgicos, respectivamente com enrofloxacino (Baytril 10%, Bayer, São Paulo, SP, Brasil) na dose de 2,5 mg/kg e Cetoprofeno (Ketojet 100 mg, Agener União) na dose de 1 mg/kg, administradas uma vez ao dia por via intramuscular, durante cinco dias (Manso et al., 2011). Após uma semana de recuperação pós-cirúrgica foi implementada uma dieta para animais silvestres modificada, com baixos teores de cálcio (BTCa) 0,14% e de fósforo < 1% (Algomix Agroindustrial Ltda) nos grupos 2 e 3, por um período de 45 dias, de acordo com protocolos estabelecidos para o modelo de osteoporose em coelhas (Mardas et al., 2011). Os animais do grupo 1 receberam dieta normal. Após esse período de 45 dias, a 2ª densitometria foi realizada em todos os animais submetidos a OV (grupo 2 e 3) e na sequência o processo de gavagem começou em todos os grupos. O grupo 1 e 2 receberam placebo e o grupo 3 recebeu alendronato de sódio. A terapia com medicamento ou placebo foi implementada nos animais, por gavagem semanal, com auxílio de um cateter orogástrico de silicone (Tsetsenekou et al.,

2012), sob o efeito de sedação inalatória com máscara oro facial, utilizando-se para tal, uma mistura de oxigênio puro medicinal e isoflurano 1% (Mardas et al., 2011). O alendronato de sódio foi preparado em cápsulas de 2 mg e envasado na farmácia de manipulação do Centro de Ciência da Saúde da UFRJ. A dose de medicação que cada animal recebia era estipulada de acordo com cálculo alométrico, após pesagem do mesmo.

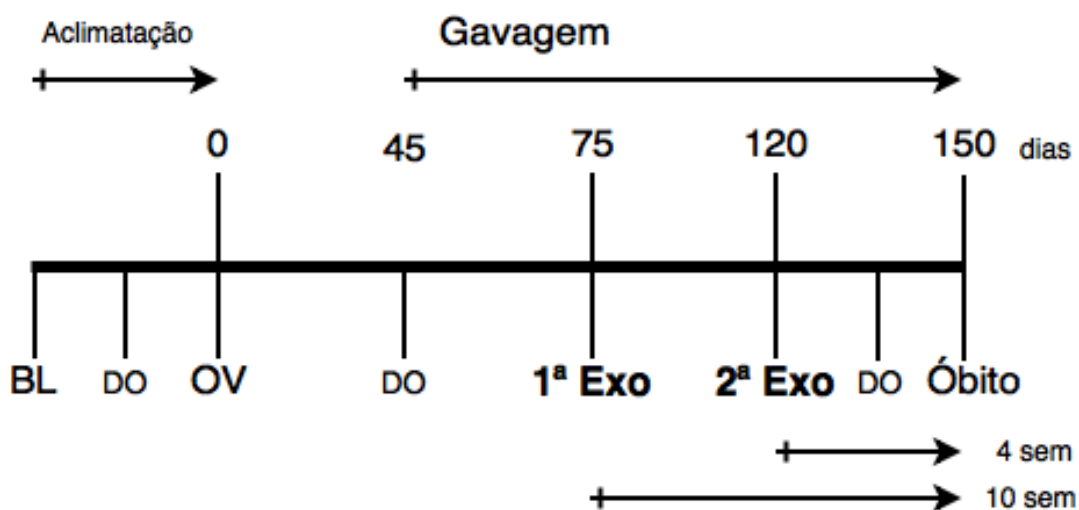


Figura 1. Linha de tempo do estudo. BL, “baseline”; DO, densitometria óssea; OV, cirurgia de ovariectomia ou ovariectomia simulada; Exo, exodontia; sem, semanas de cicatrização.

Cálculo alométrico da dose terapêutica

O cálculo alométrico da dose terapêutica de alendronato de sódio para coelho com 4 kg de peso foi feito por extrapolação interespecífica (Pachaly 2006). O animal-modelo nesse caso foi o homem adulto, pesando 70 kg. O protocolo terapêutico indicado pela literatura é uma

dose de 70 mg, administrada a cada 7 dias ou 168 horas (Bagger et al., 2003). Esse cálculo baseia-se na taxa metabólica basal (TMB) do homem = $K.M^{0,75} = 70 \times 70^{0,75} = 70 \times 24,20 = 1.694$ Kcal. Sendo K (constante teórica de proporcionalidade) = 70; M (massa corporal) = 70, elevado a 0,75, correspondente a inclinação da reta de regressão linear simples quando taxas de consumo de oxigênio em uma grande variedade de organismos são plotadas contra a massa corporal (log das coordenadas de uma correlação moderada). Já, para o animal-alvo a TMB coelho = $K.M^{0,75} = 70 \times 4^{0,75} = 70 \times 2,83 = 197,99$ Kcal. Em seguida divide-se a dose total (DT) indicada pela literatura para o animal-modelo por sua TMB: $DT \text{ homem} \div TMB \text{ homem} = 70 \text{ mg} \div 1.694 \text{ Kcal} = 0,041 \text{ mg/Kcal}$. A seguir, o valor obtido é multiplicado pela TMB do animal-alvo, obtendo-se a dose total para o coelho de 4 kg, a cada administração: $0,041 \text{ mg/Kcal} \times 197,99 \text{ Kcal} = 8,18 \text{ mg}$. Dividindo-se a DT pela massa alcança-se a dose em mg/kg: $8,18 \text{ mg} \div 4 \text{ kg} = 2,04 \text{ mg/kg}$.

Para estabelecer a frequência de administração, calculou-se a taxa metabólica específica (TME) do animal-modelo e do animal-alvo: $TME \text{ homem} = (70 \times 70^{0,75}) \div 70 = 24,2$ Kcal; $TME \text{ coelho} = (70 \times 4^{0,75}) \div 4 = 49,50$ Kcal. Em seguida, multiplicou-se a TME do animal-modelo pelo intervalo de administração indicado para ele pela literatura, em horas: $TME \text{ homem} \times \text{Intervalo homem} = 24,2 \text{ Kcal} \times 168 \text{ horas} = 4,065,6 \text{ Kcal/hora}$. Finalmente, dividiu-se o resultado pela TME do animal-alvo: $4.065,6 \text{ Kcal/hora} \div 49,50 \text{ Kcal} = 82,13$ horas. Assim, o intervalo de administração entre doses de alendronato para um coelho pesando 4 kg seria de 3,4 dias ou duas vezes por semana. No entanto, devido ao desgaste do animal no processo de gavagem, decidiu-se por uma dose única semanal de 16 mg diluídos em 10 mL de água destilada. Os animais do grupo placebo receberam 10 mL de água destilada por semana.

Procedimentos cirúrgicos de exodontia

Concomitantemente ao início da terapia medicamentosa, restabeleceu-se a ingestão de ração com teores normais de cálcio e fósforo no grupo OV+AL a fim de se mimetizar o tratamento em mulheres menopausadas (Fuchs et al., 2008). Os animais do grupo OV+PL continuaram com a dieta BTCa até o fim do experimento. Decorridos 30 dias de gavagem, a 3^a densitometria foi realizada no grupo OV+AL e só então as cirurgias de extração dentária começaram em todos os animais. O procedimento cirúrgico de extração dentária foi realizado sob anestesia com ketamina e xilazina por via intramuscular. O acesso aos dentes a serem extraídos foi facilitado com uma abordagem oral externa, por meio de incisão de 1cm de extensão da comissura labial até o último molar. A região cervical dos dentes e o osso alveolar foram expostos através da elevação de retalho mucoperiosteio. Os dentes foram luxados com periótomos e, em seguida, extraídos com fórceps pediátrico (Manso et al., 2011). As feridas cirúrgicas foram suturadas em camadas respeitando-se os tecidos subcutâneo, muscular e mucoso com fio de ácido poliglicólico 4.0 (Shalom Medical, Goiânia, GO, Brasil). A pele foi suturada com fio de nylon 4.0 (Sertix, Shalom Medical). A extração dos dentes 34 e 24 foi considerada o “baseline” do experimento para as análises posteriores do alvéolo dentário. Após seis semanas de cicatrização dos alvéolos dos dentes 34 e 24, os dentes 14 e 44 foram extraídos na sequência. Após o período de cicatrização alveolar de 10 semanas a contar da primeira extração, os animais foram induzidos ao óbito com uma dose de tiopental de 100 mg/kg (Mardas et al., 2011). A última densitometria foi feita em todos os animais antes do óbito.

Coleta de amostras

Imediatamente após o sacrifício dos animais, as mandíbulas e as maxilas foram dissecadas e as amostras de tecido ósseo foram armazenadas em formol tamponado a 10%. Amostras das regiões dos dentes 14 e 24 foram coletadas com broca trefina 4.3 mm (Neodent, Curitiba, PR, Brasil). Para análise óssea das regiões dos dentes 34 e 44, a mandíbula foi inteiramente dissecada e segmentos que se estenderam do forame mentoniano ao último molar foram obtidos com a ajuda de um disco diamantado de dupla face.

Microtomografia Computadorizada (μ CT)

O volume de osso neoformado (BV) foi mensurado através de imagens digitalizadas em três dimensões pela técnica da μ CT. Para aquisição das imagens foi utilizado o microtomógrafo (μ T) Skyscan 1173 (Bruker Co., Kontich, Bélgica) pertencente ao Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN) do Programa de Engenharia Nuclear/Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia/Universidade Federal do Rio de Janeiro (PEN/COPPE/UFRJ). Uma vez posicionados no interior do μ T, iniciou-se a aquisição com energia de 55 kV, corrente de 145 μ A e filtro de alumínio de 1,0 mm de espessura. Utilizou-se uma matriz de 1024 x 1024 pixels que gerou um tamanho de pixel igual a 14,96 μ m. Para tal, as amostras foram rotacionadas 360° e a cada passo de 0,4° eram feitas projeções radiográficas de cinco quadros com movimento aleatório, variando o eixo y, com tempo de escaneamento médio de 40 minutos por amostra. As projeções bidimensionais das imagens foram arquivadas em formato 16 bits-TIFF e utilizadas para a reconstrução. A etapa seguinte à aquisição consistiu na reconstrução das seções transversais a partir das imagens das projeções angulares. Utilizou-se para isto o programa NRecon 1.6.5.8 (Bruker Corp., Kontich, Bélgica), baseado em algoritmo descrito para medições de conectividade tridimensional (Feldkamp et al., 1989). As imagens foram arquivadas em formato bitmap (BMP). Através do

programa CTAn® (Bruker Corp.) foi escolhido um volume de interesse (VOI) cilíndrico, começando no sentido inferior para superior, na primeira fatia axial após o canal mandibular e a última fatia a 4 mm da inicial, totalizando 269 fatias. As corticais foram excluídas e somente o osso trabecular neoformado foi analisado e quantificado. O sistema de símbolos desenvolvido por Parfitt et al. (1987) foi utilizado como ferramenta de análises, estando este de acordo com a simbologia proposta pela Sociedade Americana de Pesquisa Mineral Óssea (“American Society of Bone and Mineral Research” [ASBMR]).

Tomografia computadorizada (TC) de feixes cônicos e análise fractal

A arquitetura trabecular do osso neoformado foi examinada por TC e, nas imagens digitalizadas, as alterações foram mensuradas pela técnica da dimensão fractal (DF). As imagens tridimensionais das mandíbulas das coelhas foram obtidas com tomógrafo PreXion 3D Scanner e reconstruídas com o programa PreXion 3D Software (PreXion, Inc., San Mateo, CA, USA). A reconstrução axial selecionada correspondeu a região de maior abertura do forame mental, no ponto central de intersecção entre duas linhas de referência correspondentes aos planos sagital e coronal. A imagem coronal correspondente à região anteriormente citada foi ampliada 3,5 vezes e arquivada em JPG. Em seguida, foi selecionada uma região de interesse (ROI) oval, na região apical do alvéolo em cicatrização acima do canal mandibular de cada animal, com o programa ImageJ 1.47v (NIH, Bethesda, MD, USA). Para análise do osso trabecular, a imagem foi duplicada e aplicou-se na imagem 1 o filtro Gaussiano Sigma 35 para reduzir grandes variações do brilho. A imagem com filtro foi subtraída daquela sem filtro e adicionou-se o valor 128 da escala de cinza a cada pixel. A imagem resultante foi binarizada e por meio deste processo as trabéculas ósseas foram representadas pela cor branca e os espaços medulares pela cor preta. Posteriormente, a

imagem passou pelos processos da erosão e dilatação para minimizar o seu ruído. A última etapa foi a esqueletização da imagem e o cálculo de sua dimensão fractal pelo método “box-counting” (Majumdar et al., 1993).

Quantificação do colágeno tipo I e das suas reticulações enzimáticas e não enzimáticas

As análises de colágeno tipo I foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Viguet-Carrin et al. (2008), com algumas modificações. As amostras de osso foram congeladas em nitrogênio líquido e moídas em um gral de metal. Alíquotas de aproximadamente 20 mg de osso moído foram hidrolisadas com 2 mL de HCL 6 M a 110 °C por 20 h em tubos de vidro selados. Os teores de hidroxiprolina foram determinados por espectrofotometria nas amostras hidrolisadas usando kit comercial (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A quantidade de colágeno no osso foi calculada presumindo que um mol de colágeno contém 300 nmoles de hidroxiprolina. Os “crosslinks” maduros de colágeno tipo I, piridinolina (PYD), deoxipiridinolina (DPD) e pentosidina (PEN), foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em um sistema Shimadzu (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) contendo uma bomba quaternária LC-20AT, um controlador CBM-20A, um degaseificador DGU-20A5 e um detector de fluorescência RF-10AXL. Antes de serem injetadas no cromatógrafo, as amostras foram concentradas sob fluxo de N₂ e, em seguida, adicionadas a uma solução contendo o padrão interno (INT STD). Os “crosslinks” foram, então, separados numa coluna de fase reversa Atlantis dC18 (3 µm, 4.6 mm x 100 mm), protegida por coluna de guarda (Waters Corp., Milford, MA, USA). O fluxo da fase móvel foi de 1,2 mL/min. Foi realizada eluição por gradiente, sendo o mesmo composto pelos solventes A (solução aquosa de anidrido heptafluorobutírico [HFBA] a 12% e B (50% do solvente A e 50% de acetonitrila). As fluorescências de PYD, DPD e INT STD foram

monitoradas em comprimentos de onda de emissão e excitação de 395 nm e 297 nm, respectivamente. Para detecção de PEN, os comprimentos de onda de emissão e excitação foram alterados para 385 nm e 335 nm, respectivamente. Os “crosslinks” foram identificados pelos seus tempos de retenção e quantificados a partir das áreas dos picos, usando padronização interna, com o objetivo de compensar eventuais perdas de analitos durante o procedimento de preparo das amostras.

Análise estatística

Os resultados obtidos em duplicata ou triplicata de cada animal, nos experimentos diversos, foram inseridos em planilha do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences Inc., Chicago, IL, USA) versão 21 e transformados em médias \pm desvio padrão. Para calcular as diferenças entre os grupos, ao longo dos tempos experimentais, aplicou-se a análise de variância para medidas repetidas (“one-way ANOVA”), seguido do teste post-hoc de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para valores de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Dos vinte e cinco animais incluídos neste estudo, quatro foram perdidos nas diversas etapas do mesmo, sendo dois do grupo SH+PL, um do grupo OV+PL e um do grupo OV+AL. Desses um morreu por asfixia durante procedimento de gavagem, tendo recebido acidentalmente medicamento pela via orotraqueal ao invés da via orogástrica. Um foi excluído devido a fratura de quadril durante sua manipulação no processo de anestesia para gavagem. O terceiro faleceu por causa desconhecida e o quarto animal veio a óbito na mesa cirúrgica ao não resistir ao procedimento de exodontia. Os vinte e um restantes não apresentaram complicações pós cirúrgicas ou sinais macroscópicos de infecção e foram submetidos a densitometria óssea. Amostras desses foram processadas para cromatografia líquida de alta eficiência. Nove foram utilizados para micro tomografia computadorizada e amostras de vinte animais foram submetidas a análise fractal.

Densitometria óssea

A média da densidade mineral óssea (DMO, g/cm^2) dos animais do grupo SH+PL não apresentou alteração entre o início e o término do estudo. Por outro lado, as coelhas do grupo OV+PL tiveram uma redução estatisticamente significativa da sua massa óssea no mesmo período, de aproximadamente 13% ($p = 0,0046$). Já a DMO do grupo OV+AL, após 45 dias da castração, foi reduzida em aproximadamente 17% e após 105 dias de tratamento com alendronato de sódio, foi revertida aos níveis basais. Estas alterações foram estatisticamente

significativas ($p = 0,0001$ para ambos os tempos). Não houve diferença estatisticamente significantes entre os grupos OV+PL e SH+PL no início e ao final do estudo (Figura 2).

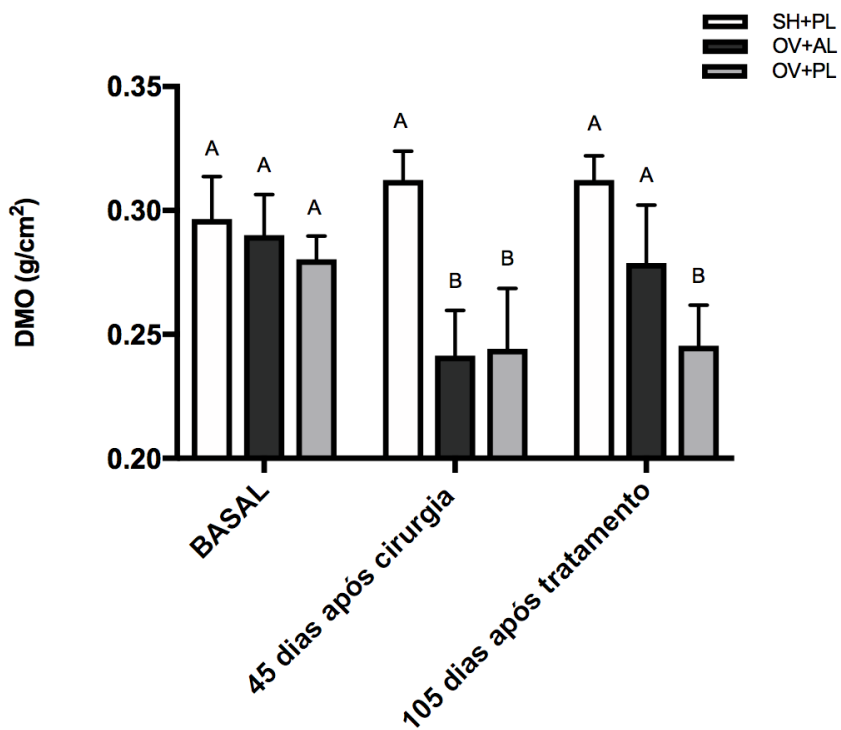


Figura 2. Comparação entre grupos (SH+PL, [N = 6]; OV+AL, [N = 7]; OV+PL, [N = 4]) dos resultados da densitometria óssea (DMO) de corpo todo, em diferentes tempos ao longo do estudo. Colunas com letras diferentes possuem diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$, ANOVA seguida de teste pós-hoc de Tukey).

Micro tomografia computadorizada

Na figura 3, pode-se observar que não houve diferença estatisticamente significativa no volume ósseo (VO), entre os grupos experimentais, na fase inicial de cicatrização alveolar (4 semanas). Já na fase tardia de reparo alveolar (10 semanas), o grupo OV+AL apresentou média de VO neoformado estatisticamente superior à do grupo OV + PL .

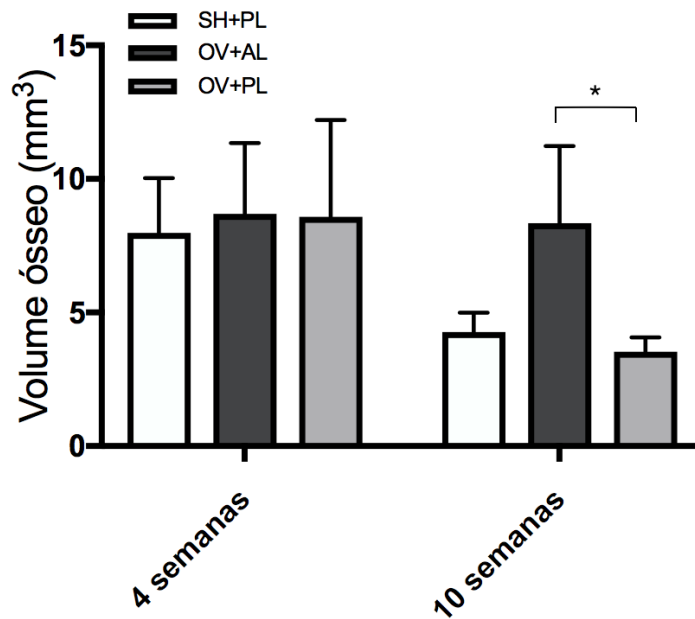


Figura 3. Comparação entre os grupos experimentais (SH+PL, [N = 3]; OV+AL, [N = 3]; OV+PL, [N = 3]) dos dados médios de volume ósseo alveolar neoformado após 4 e 10 semanas da extração dentária. *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$, ANOVA seguida de teste post-hoc de Tukey).

Análise Fractal

A comparação entre os dados médios da dimensão fractal de imagens tomográficas, obtidas dos alvéolos em cicatrização inicial (4 semanas) e tardia (10 semanas), revelou uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo OV+PL e o grupo OV+AL na fase tardia de cicatrização (Figura 4).

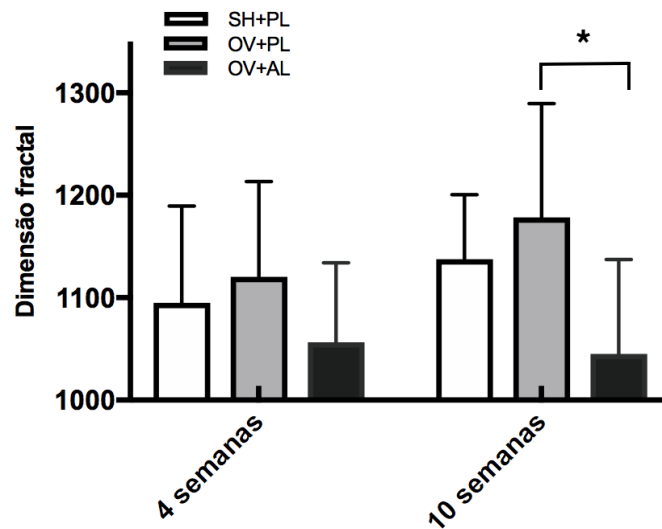


Figura 4. Comparação entre os grupos experimentais (SH+PL, [N = 5]; OV+AL, [N = 7]; OV+PL, [N = 6]) dos dados médios da dimensão fractal calculados a partir de imagens tomográficas dos alvéolos em reparo, após 4 e 10 semanas de extração. * Diferença estatisticamente significativa ($p = 0.048$, ANOVA seguida de teste post-hoc de Tukey).

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Os resultados mostraram que no grupo OV+AL houve uma produção de colágeno, aferida pela quantificação de hidroxiprolina, nos alvéolos com 4 e 10 semanas de cicatrização, aproximadamente duas vezes maior do que a apresentada pelo grupo SH+PL e aproximadamente quatro vezes maior comparada ao grupo OV+PL (Figura 5).

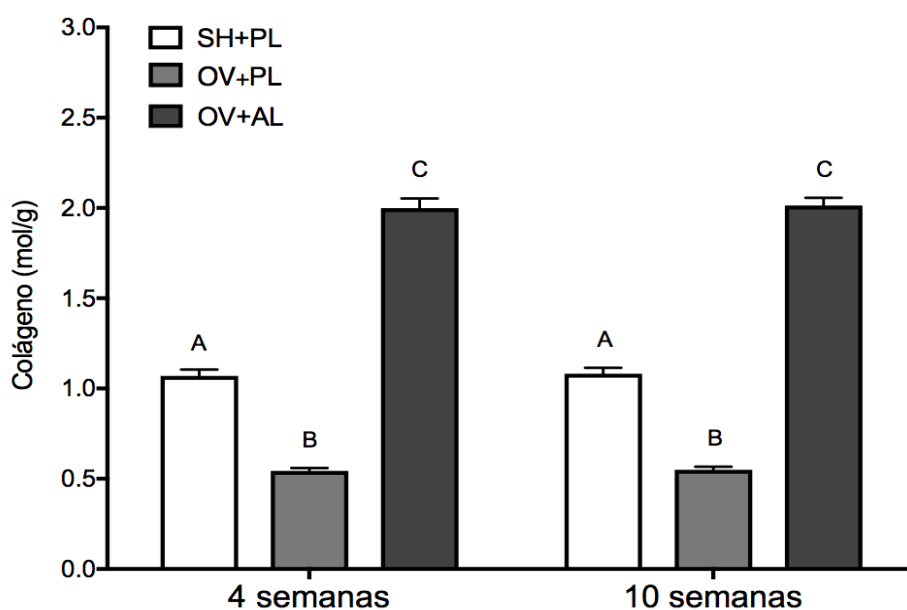


Figura 5. Comparação entre os grupos experimentais (SH+PL, [N = 6]; OV+AL, [N = 10]; OV+PL, [N = 8]) da quantidade média de colágeno. Colunas com letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$, ANOVA seguida de teste post-hoc de Tukey).

Em relação a reticulação não enzimática do colágeno tipo I, os resultados demonstram que a pentosidina estava aumentada de maneira estatisticamente significativa nos grupos OV+AL e OV+PL, tanto na cicatrização inicial quanto na cicatrização tardia, em comparação com o grupo SH+PL (Figura 6).

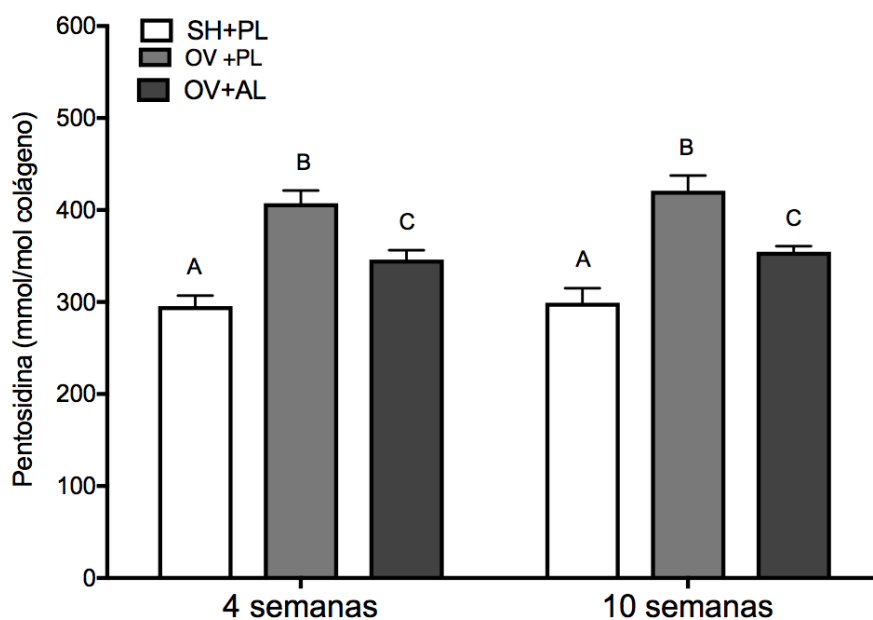


Figura 6. Comparação entre os grupos experimentais (SH+PL, [N = 6]; OV+AL, [N = 10]; OV+PL, [N = 8]) da quantidade média de pentosidina em relação ao colágeno total. Colunas com letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$, ANOVA seguida de teste post-hoc de Tukey)

As ligações cruzadas trivalentes das moléculas do colágeno tipo I, presentes no osso alveolar neoformado e analisadas pela soma da deoxipiridinolina (DPD) e da piridinolina (PYD), foram encontradas em maior quantidade no grupo OV+PL em comparação com os demais grupos, tanto na cicatrização inicial (4 semanas) como na tardia (10 semanas). O grupo OV+AL foi o que apresentou a menor quantidade de DPD+PYD, sendo a diferença em relação ao grupo SH+PL estatisticamente significativa, nos dois tempos de análise (Figura 7).

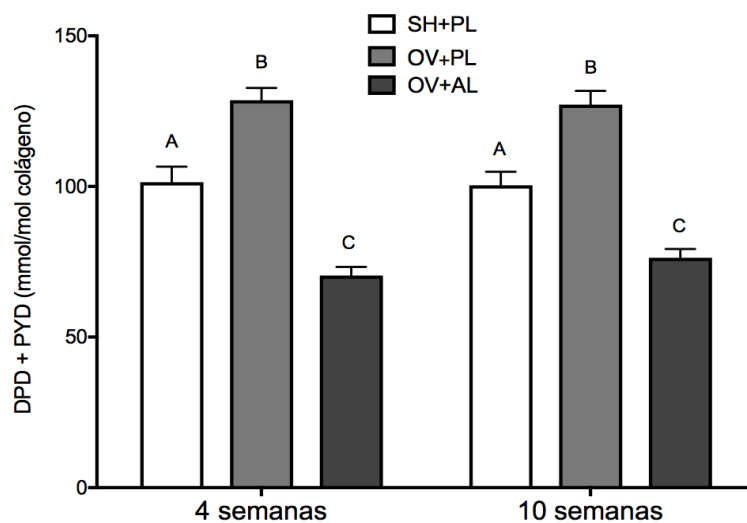


Figura 7. Comparação entre os grupos experimentais (SH+PL, [N = 6]; OV+AL, [N = 10]; OV+PL, [N = 8]) da quantidade média de “crosslinks” maduros, piridinolina (PYD) e deoxipiridinolina (DPD), somadas, em relação ao colágeno total. Colunas com letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$, ANOVA seguida de teste post-hoc de Tukey).

DISCUSSÃO

No presente estudo ficou demonstrado que a terapia com alendronato de sódio é capaz de reverter a baixa densidade mineral do osso neoformado em alvéolo de coelhas ovariectomizadas. No entanto, o bisfosfonato não foi totalmente efetivo em resgatar nos animais osteoporóticos a qualidade do osso neoformado nos animais controle. Isso é fato, especificamente, quando se observa o acúmulo maior de pentosidina na reticulação do colágeno tipo I que compõe a matriz orgânica óssea dos animais ovariectomizados em comparação aos animais controle. A pentosidina, o mais comum dos “AGEs” presentes no esqueleto, tem sido associada a fragilidade do osso em organismos envelhecidos e/ou afetados por patologias como a diabetes mellitus e a osteoporose (Saito & Marumo, 2010; Karim & Bouxsein, 2016). Além disso, há relatos de que a terapia de longo prazo com bisfosfonatos pode afetar a qualidade óssea e levar a aumento na incidência de fraturas atípicas do fêmur (Isaacs et al., 2010). Essas fraturas, por sua vez, podem estar associadas a qualidade da reticulação do colágeno tipo I, conforme demonstrado em estudos *in vitro* e clínico (Tang et al., 2007; Viguet-Carrin et al., 2009; Neumann et al., 2014). O impacto da perda de qualidade óssea em alvéolo dentário não é imediatamente aquilatável em termos clínicos, mas esse achado pode ser útil como indicador da saúde sistêmica do indivíduo. Por exemplo, poder-se-ia diagnosticar uma condição de baixa densidade mineral do esqueleto, a partir da análise fractal de radiografia dos maxilares feita rotineiramente para fins odontológicos, o que teria implicações de ordem prática e econômica (Gulsahi 2015; Mostafa et al., 2016).

Os resultados apresentados agora são parcialmente validados pela densitometria de corpo inteiro dos animais, indicando que o modelo de indução de osteoporose por ovariectomia e dieta com baixos teores de cálcio e fósforo conseguiu reduzir a massa óssea nas coelhas, corroborando com os estudos de outros autores (Martin-Monge et al., 2011). A redução de 17% na massa óssea do grupo teste é idêntica a encontrada na vértebra lombar de coelhas após 6 semanas de indução de osteoporose (Castaneda et al., 2008). No entanto, esse resultado ficou aquém do definido pela Organização Mundial da Saúde que é de aproximadamente 25% de redução em mulheres osteoporóticas (Lill et al., 2002). O modelo de coelhas ovariectomizadas e alimentadas com teores reduzidos de cálcio e fósforo para reproduzir a condição de restrição de estrogênio em mulheres menopausadas tem sido o escolhido por diversos autores (Mardas et al, 2011; Martin-Monge et al., 2011). Outros conseguem reduzir mais drasticamente a massa óssea desses animais complementando a ovariectomia com injeção de corticosteróide (Baofeng et al., 2010). No entanto, o tratamento com corticosteróide, por si só, afeta negativamente a remodelagem óssea causando, além de osteoporose não necessariamente similar a de mulheres menopausadas, efeitos deletérios sobre os tecidos cartilagosos e mesmo morte (Warman & Boskey, 1983, Grardel et al., 1994). De qualquer modo, o coelho é um dos animais mais comumente utilizados em pesquisa médica, respondendo por aproximadamente 35% dos estudos na área musculoesquelética (Neyt et al., 1998). As razões principais disso são o seu tamanho e a facilidade de manuseio, além da precocidade em atingir a maturidade esquelética logo após a maturidade sexual que ocorre aos 6 meses de idade (Gilsanz et al., 1988). Apesar disso, dentre os mamíferos de maior porte mais utilizados como modelos de investigação na área da saúde, o esqueleto do coelho é o que apresenta a menor similaridade com o osso humano, o

que poderia dificultar a extrapolação de resultados de laboratório para a resposta clínica (Pearce et al., 2007). Esse fato deve ser considerado como uma limitação do presente estudo. Mesmo assim, há vantagens em se utilizar coelhas, em comparação com ratas ovariectomizadas consideradas modelo experimental “padrão ouro” para estudos de osteoporose pós menopausal (Frost & Jee, 1992; Lelovas et al., 2008). Ratos não atingem maturidade esquelética verdadeira, não apresentam sistema Harvesiano e possuem uma taxa baixa de remodelagem do osso cortical (Rodgers et al., 1993; Mosekilde 1995). Já, coelhos apresentam alteração esquelética intracortical e remodelagem óssea Haversiana mais aceleradas (Castaneda et al., 2006).

Para se estabelecer a dosagem de alendronato de sódio utilizada para reverter o quadro osteoporótico, lançou-se mão do cálculo alométrico por extrapolação interespecífica (Pachaly 2006). Isso deve ser considerado uma vantagem metodológica do presente estudo se for levado em conta que pesquisas semelhantes utilizaram posologias aleatórias e variadas de bisfosfonato, o que torna difícil a comparação dos dados alcançados com os descritos aqui. Em, pelo menos, um estudo em ratas utilizou-se gavagem de alendronato de sódio numa dose tão baixa quanto 0,05mg/kg/semana, o que representa uma exposição 300 vezes menor que a utilizada em mulheres osteoporóticas (Maahs et al., 2011). Por outro lado, a dose de 2,5mg/kg/dia de medicamento aplicada por via subcutânea, no mesmo modelo animal, é quase 100 vezes superior ao que normalmente se utilizaria em ratas, o que gera resultados que não podem ser extrapolados para outras espécies, incluindo humanos (Yamamoto-Silva et al., 2013).

Os benefícios alcançados com o uso de bisfosfonatos são inquestionáveis quando se avalia o impacto dessa classe de medicamentos sobre a qualidade de vida dos pacientes osteoporóticos (Wells et al., 2008). Indivíduos afetados por outras formas de doenças ósseas, incluindo a metástase óssea e a hipercalcemia da malignidade, da mesma forma se beneficiam da terapia anti-reabsortiva com bisfosfonatos (Diener 1996; Oura et al., 2000; Oida et al., 2012). No entanto, evidências recentes têm associado o uso prolongado desses medicamentos com formas atípicas de fraturas ósseas (Drieling et al., 2017). Estas, por sua vez, resultam de uma remodelagem deficiente do esqueleto, já que os bisfosfonatos inibem a ação reabsortiva dos osteoclastos (Kharwadkar et al., 2017). Os dados reportados aqui confirmam esse efeito sobre a remodelagem óssea haja vista que o grupo tratado com alendronato de sódio apresentou maior acúmulo de osso, especificamente na fase tardia de reparo alveolar, sob análise em micro tomografia computadorizada (μ CT). Interessante mencionar que, apesar desse maior volume, a dimensão fractal do osso neoformado no grupo (OV+AL) foi menor que a do grupo OV+PL. Deve ser salientado, no entanto, que estudos baseados em μ CT de alvéolos dentários não conseguiram mostrar de forma inequívoca os efeitos dos bisfosfonatos sobre o processo de cicatrização óssea após a extração dentária. Enquanto, em um estudo com ratas ovariectomizadas foi reportado que a administração de alendronato de sódio aumentou a densidade óssea comparada ao grupo controle ao fim de quatro semanas (Jee et al., 2010), outro concluiu que ao final do mesmo período a densidade da trabécula óssea foi menor no grupo que fez uso do alendronato (Yamazaki et al., 2013). Para contornar essa questão metodológica, foram utilizadas aqui técnicas redundantes e confirmatórias para mensuração das alterações ósseas alveolares como a tomografia computadorizada de feixes cônicos e a μ CT, além da densitometria óssea aplicada ao esqueleto como um todo. Na verdade, os

esqueleto como um todo. Na verdade, os resultados reportados aqui, nas diferentes técnicas, são consistentes entre si e confirmam os achados de outros autores de que a dimensão fractal aumenta quando a massa óssea decresce (Ruttimann et al., 1992; Bollen et al., 2001).

Como já discutido, apesar dos benefícios proporcionados pelo emprego de bisfosfonatos, estes medicamentos afetam a remodelagem óssea. Este efeito baseia-se na capacidade que os bisfosfonatos têm em diminuir a atividade dos osteoclastos, em inibir a diferenciação de suas células progenitoras, em reduzir seu recrutamento para o tecido ósseo e, também, em abreviar sua sobrevivência pela indução à apoptose (Gossiel et al., 2016). A atuação do alendronato de sódio sobre a matriz óssea pode, inclusive, mimetizar condições esqueléticas envelhecidas ou de patologias como a osteoporose e a diabetes mellitus (Saito & Marumo, 2015; Karim & Bouxsein, 2016). Um dos efeitos indiretos dos bisfosfonatos sobre a remodelagem óssea diminuída poderia ser através da persistência de um conteúdo aumentado de pentosidina na matriz colágena, como demonstrado agora. Isso poderia explicar uma menor atividade celular reabsortiva, também, já que existe evidência da ação inibitória de AGEs sobre o processo de diferenciação osteoclástica, além da alteração da integridade estrutural das proteínas da matriz (Valcourt et al., 2007). Essa alteração, por sua vez, provoca aumento de resistência do osso à remodelagem pela diminuição da degradação proteolítica e reciclagem do colágeno, o que favorece o acúmulo de micro danos no tecido mineralizado (Zioupos et al., 1999) e o seu envelhecimento acelerado (Danielsen 1990). A integridade reduzida da matriz óssea pode estar relacionada, ainda, com a presença de reticulação enzimática trivalente, madura e insolúvel, do colágeno tipo I, representada pela piridinolina e pela deoxipiridinolina. Níveis elevados desses dois analitos combinados, como visto no grupo osteoporótico, confirmam os achados de outros trabalhos e caracterizam uma matriz colágena amadurecida

(Hernandez et al., 2005; Saito et al., 2006b; Gourion-Arsiquaud et al., 2010, Saito & Marumo, 2010). Esta, por sua vez, está associada ao envelhecimento do esqueleto, ao aumento da fragilidade óssea com maior risco de fraturas e à perda de resistência do osso à força compressiva (Paschalis et al., 2004; Saito et al., 2006a; Saito et al., 2006b).

A implicação prática de um alvéolo reparado com as características apresentadas e discutidas aqui vai além do escopo deste trabalho. Para pesquisas a serem desenvolvidas nesse campo, seria interessante testar, por exemplo, se implantes de titânio para substituição dentária teriam padrões de osteointegração e de longevidade funcional semelhantes aqueles inseridos em alvéolo reparado sem influência de bisfosfonatos. De qualquer modo, seria aconselhável a realização de estudos adicionais nessa linha com potência adequada para se tecer conclusões com a desejável validade externa (Steckler & McLeroy, 2008). No presente estudo não foi feito cálculo de tamanho amostral, o que pode ser considerado outra fragilidade deste. Deve ser salientado, ainda, que a perda de animais no curso dos experimentos pode ter afetado a análise comparativa entre os grupos. No entanto, esta perda aconteceu de maneira aproximadamente equilibrada nos grupos experimentais. Mais importante, a maioria das análises comparativas relatadas aqui tem potência suficiente para apontar diferenças estatisticamente significantes entre os grupos testados, o que minimiza a importância do cálculo amostral neste caso. De fato, o equilíbrio ideal entre se usar o número menor possível de animais experimentais por questão ética e a necessidade de se obter resultados robustos a partir de um tamanho amostral calculado *a priori* é motivo de debate acadêmico em andamento (Button et al., 2013).

Em resumo, o presente estudo confirmou a capacidade do modelo de coelhas ovariectomizadas e alimentadas com dieta de baixos teores de cálcio e fósforo em desenvolver

condições de densidade mineral reduzida no osso neoformado em alvéolo dentário, semelhantes a osteoporose de mulheres menopausadas. Além disso, ficou demonstrado que a terapia com alendronato de sódio foi capaz de reverter esse quadro de perda óssea, mas o osso neoformado apresentou características associadas a condições encontradas em esqueleto envelhecido ou em patologias como a diabetes mellitus. A interpretação clínica desses achados deverá ser motivo de investigação adicional. Finalmente, seria de interesse científico e prático explorar o efeito de outras terapias anti-reabsortivas sobre a qualidade do osso neoformado num modelo intrabucal, como o utilizado aqui.

CONCLUSÃO

A terapia com alendronato de sódio proporciona aumento no volume ósseo e no acúmulo de colágeno tipo I, mas não resgata totalmente a qualidade do tecido alveolar não-osteoporótico, evidenciado pela quantidade aumentada de reticulação colágena não-enzimática.

REFERÊNCIAS

Anastasilakis AD, Goulis DG, Kita M, Avramidis A. Oral bisphosphonate adverse effects in 849 patients with metabolic bone diseases. *Hormones (Athens)*. 2007;6(3):233-41.

Araújo MG, Silva CO, Misawa M, Sukekava F. Alveolar socket healing: what can we learn? *Periodontol 2000*. 2015;68(1):122-34.

Bagger YZ, Tanko LB, Alexandersen P, Ravn P, Christiansen C. Alendronate has a residual effect on bone mass in postmenopausal Danish women up to 7 years after treatment withdrawal. *Bone*. 2003;33:301–307.

Banse X, Sims TJ, Bailey AJ. Mechanical properties of adult vertebral cancellous bone: correlation with collagen intermolecular cross-links. *J Bone Miner Res*. 2002; 17:1621-1628.

Bagi CM, DeLeon E, Ammann P, Rizzoli R, Miller SC. Histo-anatomy of the proximal femur in rats: impact of ovariectomy on bone mass, structure, and stiffness. *Anat Rec*. 1996;245(4):633-44.

Bagi CM, Wilkie D, Georgelos K, Williams D, Bertolini D. Morphological and structural characteristics of the proximal femur in human and rat. *Bone*. 1997;21(3):261-7.

Bailey AJ, Paul RG, Knott L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mech Ageing Dev*. 1998;106(1-2):1–56.

Baofeng L, Zhi Y, Bei C, Guolin M, Qingshui Y, Jian L. Characterization of a rabbit osteoporosis model induced by ovariectomy and glucocorticoid. *Acta Orthop*. 2010; 81(3): 396–401.

Beaupre LA, Morrish DW, Hanley DA, Maksymowych WP, Bell NR, Juby AG, Majumdar SR. Oral bisphosphonates are associated with reduced mortality after hip fracture. *Osteoporos Int*. 2011;22(3):983-91.

Bollen A-M, Taguchi A , Hujoel PP, Hollender LG. Fractal dimension on dental radiographs. *Dentomaxillofac Radiol*. 2001;30:270-275.

Button KS, Ioannidis JP, Mokrysz C, Nosek BA , Flint J, Robinson ES, Munafò MR. Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(5):365-76.

Calciolari E, Donos N, Park JC, Petrie A, Mardas N. A systematic review on the correlation between skeletal and jaw bone mineral density in osteoporotic subjects. *Clin Oral Implants Res*. 2016;27(4):433-42.

Cao T, Shirota T, Yamazaki M, Ohno K, Michi KI. Bone mineral density in mandibles of ovariectomized rabbits. *Clin Oral Implants Res*. 2001;12(6):604-8.

- Cardaropoli G, Araújo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol.* 2003;30(9):809-18.
- Castaneda S, Calvo E, Largo R, Gonzalez-Gonzalez R, De La Piedra C, Diaz-Curiel M, Herrero-Beaumont G. Characterization of a new experimental model of osteoporosis in rabbits. *J Bone Miner Metab.* 2008;26(1):53–9.
- Castaneda S, Largo R, Calvo E, Rodriguez-Salvanes F, Marcos ME, Diaz-Curiel M, Herrero-Beaumont G. Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. *Skeletal Radiol.* 2006;35(1):34–41.
- Danielsen CC. Age-related thermal stability and susceptibility to proteolysis of rat bone collagen. *Biochem J.* 1990;272(3):697-701.
- Deeks ED, Dhillon S. Strontium ranelate: a review of its use in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Drugs.* 2010;70(6):733-59.
- Diener KM. Bisphosphonates for controlling pain from metastatic bone disease. *Am J Health Syst Pharm.* 1996;53(16):1917-27.
- Drieling RL, LaCroix AZ, Beresford SAA, Boudreau DM, Kooperberg C, Chlebowski RT, Ko MG, Heckbert SR. Long-Term Oral Bisphosphonate Therapy and Fractures in Older Women: The Women's Health Initiative. *J Am Geriatr Soc.* 2017 May 29.
- Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res.* 1989;4(1):3-11.
- Fleurence RL, Iglesias CP, Johnson JM. The cost effectiveness of bisphosphonates for the prevention and treatment of osteoporosis: a structured review of the literature. *Pharmacoeconomics.* 2007;25(11):913-33.
- Frost HM, Jee WS. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner.* 1992;18(3):227–36.
- Fuchs RK, Allen MR, Condon KW, Reinwald S, Miller LM, McClenathan D, Burr DB. Calculating clinically relevant drug doses to use in animal studies. *Osteoporos Int.* 2008;19(9):1331-41.
- Ghirardi A, Di Bari M, Zambon A, Scotti L, Della Vedova G, Lapi F, Cipriani F, Caputi AP, Vaccheri A, Gregori D, Gesuita R, Vestri A, Staniscia T, Mazzaglia G, Corrao G; BEST investigators. Effectiveness of oral bisphosphonates for primary prevention of osteoporotic fractures: evidence from the AIFA-BEST observational study. *Eur J Clin Pharmacol.* 2014;70(9):1129-37.

Gilsanz V, Roe TF, Gibbens DT, Schulz EE, Carlson ME, Gonzalez O, Boechat MI. Effect of sex steroids on peak bone density of growing rabbits. *Am J Physiol.* 1988;255(4 Pt 1):E416–21.

Gossiel F, Hoyle C, McCloskey EV, Naylor KE, Walsh J, Peel N, Eastell R. The effect of bisphosphonate treatment on osteoclast precursor cells in postmenopausal osteoporosis: The TRIO study. *Bone.* 2016;92:94-99.

Gourion-Arsiquaud S, Allen MR, Burr DB, Vashishth D, Tang SY, Boskey AL. Bisphosphonate treatment modifies canine bone mineral and matrix properties and their heterogeneity. *Bone.* 2010;46(3):666-72.

Grardel B, Sutter B, Flautre B, Viguiet E, Lavaste F, Hardouin P. Effects of glucocorticoids on skeletal growth in rabbits evaluated by dual-photon absorptiometry, microscopic connectivity and vertebral compressive strength. *Osteoporos Int.* 1994;4(4):204–10.

Gulsahi A. Osteoporosis and jaw bones in women. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2015;5(4):263-7.

Hernandez CJ1, Tang SY, Baumbach BM, Hwu PB, Sakkee AN, van der Ham F, DeGroot J, Bank RA, Keaveny TM. Trabecular microfracture and the influence of pyridinium and non-enzymatic glycation-mediated collagen cross-links. *Bone.* 2005;37(6):825-32.

Isaacs JD, Shidiak L, Harris IA, Szomor ZL. Femoral insufficiency fractures associated with prolonged bisphosphonate therapy. *Clin Orthop Relat Res.* 2010;468(12):3384-92.

Jee JH, Lee W, Lee BD. The influence of alendronate on the healing of extraction sockets of ovariectomized rats assessed by in vivo micro-computed tomography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;110(2):e47-53.

Kannegaard PN, van der Mark S, Eiken P, Abrahamsen B. Excess mortality in men compared with women following a hip fracture. National analysis of comedications, comorbidity and survival. *Age Ageing.* 2010;39(2):203-9.

Karim L, Bouxsein ML. Effect of type 2 diabetes-related non-enzymatic glycation on bone biomechanical properties. *Bone.* 2016;82:21-7.

Kaur U, Chakrabarti SS, Gambhir IS. Zoledronate Induced Hypocalcemia and Hypophosphatemia in Osteoporosis: A Cause of Concern. *Curr Drug Saf.* 2016;11(3):267-9.

Khan SA, Kanis JA, Vasikaran S, Kline WF, Matuszewski BK, McCloskey EV, Beneton MN, Gertz BJ, Sciberras DG, Holland SD, Orgee J, Coombes GM, Rogers SR, Porras AG. Elimination and biochemical responses to intravenous alendronate in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1997;12(10):1700-7.

Khan AA, Rios LP, Sándor GK, Khan N, Peters E, Rahman MO, Clokie CM, Dore E, Dubois S. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw in Ontario: a survey of oral and maxillofacial surgeons. *J Rheumatol.* 2011;38(7):1396-402.

Kharwadkar N, Mayne B, Lawrence JE, Khanduja V. Bisphosphonates and atypical subtrochanteric fractures of the femur. *Bone Joint Res.* 2017 Mar;6(3):144-153.

Klop C, van Staa TP, Cooper C, Harvey NC, de Vries F. The epidemiology of mortality after fracture in England: variation by age, sex, time, geographic location, and ethnicity. *Osteoporos Int.* 2017;28(1):161-168.

Knott L, Bailey AJ. Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone.* 1998;22(3):181-7.

Kreutle V, Blum C, Meier C, Past M, Müller B, Schütz P, Borm K. Bisphosphonate induced hypocalcaemia - report of six cases and review of the literature. *Swiss Med Wkly.* 2014;144:w13979.

Kuroda S, Mukohyama H, Kondo H, Aoki K, Ohya K, Ohyama T, Kasugai S. Bone mineral density of the mandible in ovariectomized rats: analyses using dual energy X-ray absorptiometry and peripheral quantitative computed tomography. *Oral Dis.* 2003;9(1):24-28.

Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med.* 2008;58(5):424-30.

Leslie WD, Majumdar SR, Lix LM, et al. High fracture probability with FRAX usually indicates densitometric osteoporosis: implications for clinical practice. *Osteoporos Int.* 2012;23, 391-397.

Lill CA, Gerlach UV, Eckhardt C, Goldhahn J, Schneider E. Bone changes due to glucocorticoid application in an ovariectomized animal model for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2002;13(5):407-14.

Maahs MP, Azambuja AA, Campos MM, Salum FG, Cherubini K. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats. *Head Neck.* 2011;33(2):199-207.

Majumdar S, Weinstein RS, Prasad RR. Application of fractal geometry techniques to the study of trabecular bone. *Med Phys.* 1993;20(6):1611-9.

Manolagas SC, O'Brien CA, Almeida M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2013;9(12):699-712.

Manso JE, Mourão CF, Pinheiro FA, Ferreira ML, Silva PC, Schanaider A. Molars extraction for bone graft study in rabbits. *Acta Cir Bras.* 2011;26 Suppl 2:66-9.

Mardas N, Schwarz F, Petrie A, Hakimi A-R, Donos N. The effect of SLActive surface in guided bone formation in osteoporotic-like conditions. *Clin Oral Impl Res.* 22, 2011; 406-415.

Martens M, Van Audekercke R, Delpont P, De Meester P, Mulier JC. The mechanical characteristics of cancellous bone at the upper femoral region. *J Biomech.* 1983;16(12):971-83.

Martin-Monge E, Tresguerres IF, Blanco L, Khraisat A, Rodríguez-Torres R, Tresguerres JA. Validation of an osteoporotic animal model for dental implant analyses: an in vivo densitometric study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011;26(4):725-30.

Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003;61:1115-1117.

Mazess RB. On aging bone loss. *Clin Orthop Relat Res.* 1982;(165):239-52.

Miller PD, McCarthy EF. Bisphosphonate-associated atypical sub-trochanteric femur fractures: paired bone biopsy quantitative histomorphometry before and after teriparatide administration. *Semin Arthritis Rheum.* 2015;44(5):477-82.

Mosekilde L. Assessing bone quality--animal models in preclinical osteoporosis research. *Bone.* 1995;17(4 Suppl):343S-352S.

Mostafa RA, Arnout EA, Abo el- Fotouh MM. Feasibility of cone beam computed tomography radiomorphometric analysis and fractal dimension in assessment of postmenopausal osteoporosis in correlation with dual X-ray absorptiometry. *Dentomaxillofac Radiol.* 2016; 45:1-8.

Neumann T, Lodes S, Kästner B, Franke S, Kiehntopf M, Lehmann T, Müller UA, Wolf G, Sämann A. High serum pentosidine but not esRAGE is associated with prevalent fractures in type 1 diabetes independent of bone mineral density and glycaemic control. *Osteoporos Int.* 2014;25(5):1527-33.

Neyt JG, Buckwalter JA, Carroll NC. Use of animal models in musculoskeletal research. *Iowa Orthop J.* 1998;18:118-23.

Oida T, Mimatsu K, Kano H, Kawasaki A, Kuboi Y, Fukino N, Kida K, Amano S. Administration of bisphosphonates for malignant hepatic tumor with hypercalcemia. *Hepatogastroenterology.* 2012;59(114):444-7.

Oura S, Tanino H, Yoshimasu T, Sakurai T, Nakamura T, Kokawa Y, Matsuyama K, Ohta F, Naito Y. Bisphosphonate therapy for bone metastases from breast cancer: clinical results and a new therapeutic approach. *Breast Cancer.* 2000;7(4):307-10.

Pachaly J.R. Terapêutica por Extrapolação Alométrica. In: Cubas, Z.S.; Silva, J.C.R & Catão-Dias, J.L. (Org.). *Tratado de Animais Selvagens - Medicina Veterinária.* 1 ed. São Paulo: Roca, 2006, p. 1215-1223.

Parfitt M, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of

the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 1987;2:595–610.

Paschalis EP, Shane E, Lyritis G, Skarantavos G, Mendelsohn R, Boskey AL. Bone fragility and collagen cross-links. *J Bone Miner Res.* 2004;19:2000–2004.

Patel V, McLeod NM, Rogers SN, Brennan PA. Bisphosphonate osteonecrosis of the jaw--a literature review of UK policies versus international policies on bisphosphonates, risk factors and prevention. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2011;49(4):251-7.

Pazzaglia UE, Bonaspetti G, Rodella LF, Ranchetti F, Azzola F. Design, morphometry and development of the secondary osteonal system in the femoral shaft of the rabbit. *J Anat.* 2007;211(3):303-12.

Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater.* 2007;13:1-10.

Rodgers JB1, Monier-Faugere MC, Malluche H. Animal models for the study of bone loss after cessation of ovarian function. *Bone.* 1993;14(3):369-77.

Rizzoli R, Reginster JY, Boonen S, Bréart G, Diez-Perez A, Felsenberg D, Kaufman JM, Kanis JA, Cooper C. Adverse reactions and drug-drug interactions in the management of women with postmenopausal osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 2011;89(2):91-104.

Ruttimann UE, Webber RL, Hazelrig JB. Fractal dimension from radiographs of peridental alveolar bone. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992;74:98-110.

Saito M, Fujii K, Mori Y, Marumo K. Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats. *Osteoporos Int.* 2006a;17(10):1514-23.

Saito M, Fujii K, Soshi S, Tanaka T. Reductions in degree of mineralization and enzymatic collagen cross-links and increases in glycation induced pentosidine in the femoral neck cortex in cases of femoral neck fracture. *Osteoporos Int.* 2006b;17(7):986-95.

Saito M., Marumo K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus *Osteoporos Int.* 2010;21:195–214.

Saito M, Marumo K. Effects of Collagen Crosslinking on Bone Material Properties in Health and Disease. *Calcif Tissue Int.* 2015;97(3):242-61.

Sevil F, Kara ME. The effects of ovariectomy on bone mineral density, geometrical, and biomechanical characteristics in the rabbit femur. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2010;23(1):31-6.

Shane E, Burr D, Abrahamsen B, Adler RA, Brown TD, Cheung AM, Cosman F, Curtis JR, Dell R, Dempster DW, Ebeling PR, Einhorn TA, Genant HK, Geusens P, Klaushofer K, Lane

JM, McKiernan F, McKinney R, Ng A, Nieves J, O'Keefe R, Papapoulos S, Howe TS, van der Meulen MC, Weinstein RS, Whyte MP. Atypical subtrochanteric and diaphyseal femoral fractures:second report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res.* 2014;29(1):1-23.

Shiraki M, Kuroda T, Tanaka S, Saito M, Fukunaga M, Nakamura T. Nonenzymatic collagen cross-links induced by glycooxidation (pentosidine) predicts vertebral fractures. *J Bone Miner Metab.* 2008;26(1):93-100.

Sowers M, Cruchfield M, Bandekar R, Randolph JF, Shapiro B, Schork MA, Jannausch, M. Bone mineral density and its change in pre- and peri-menopausal white women: The Michigan Bone Health Study. *J Bone Miner Res.* 1998; 13:1134-1140.

Steckler A, McLeroy KR. The importance of external validity. *Am J Public Health.* 2008; 98(1): 9–10.

Tanaka M, Ejiri S, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. *J Periodontal Res.* 2002;37(2):161-5.

Tang SY, Zeenath U, Vashishth D. Effects of non-enzymatic glycation on cancellous bone fragility. *Bone.* 2007;40(4):1144-51.

Tsetsenekou E, Papadopoulos T, Kalyvas D, Papaioannou N, Tangl S, Watzek G. The influence of alendronate on osseointegration of nano treated dental implants in New Zealand rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(6):659-66.

Ueda K, Muto M, Chiba T. A case of esophageal ulcer caused by alendronate sodium tablets. *Gastrointest Endosc.* 2011;73(5):1037-8.

Urade M, Tanaka N, Furusawa K, Shimada J, Shibata T, Kirita T, Yamamoto T, Ikebe T, Kitagawa Y, Fukuta J. Nationwide survey for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in Japan. *J Oral Maxillofac Surg.* 2011;69(11):e364-71.

Valcourt U, Merle B, Gineyts E, Viguet-Carrin S, Delmas PD, Garnero P. Non-enzymatic glycation of bone collagen modifies osteoclastic activity and differentiation. *J Biol Chem.* 2007;282(8):5691-703.

Viguet-Carrin S, Farlay D, Bala Y, Munoz F, Bouxsein ML, Delmas PD. An in vitro model to test the contribution of advanced glycation end products to bone biomechanical properties. *Bone.* 2008;42(1):139-49.

Viguet-Carrin S, Gineyts E, Bertholon C, Delmas PD. Simple and sensitive method for quantification of fluorescent enzymatic mature and senescent crosslinks of collagen in bone hydrolysate using single-column high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009;877(1-2):1-7.

Wang X, Shen X, Li X, Agrawal CM. Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone*. 2002;31(1):1-7.

Warman M, Boskey AL. Effect of high levels of corticosteroids on the lipids of the long bones of the mature rabbit. *Metab Bone Dis Relat Res*. 1983;4(5):319–24.

Wells GA, Cranney A, Peterson J, Boucher M, Shea B, Robinson V, Coyle D, Tugwell P. Alendronate for the primary and secondary prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008;23(1):CD001155.

WHO. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 1994;843:1-129.

Yamamoto-Silva FP, Bradaschia-Correa V, Lima LA, Arana-Chavez VE. Ultrastructural and immunohistochemical study of early repair of alveolar sockets after the extraction of molars from alendronate-treated rats. *Microsc Res Tech*. 2013;76(6):633-40.

Yamazaki T, Hiruma N, Miake Y, Moriguti M, Sawada T, Yamamoto H, Yanagisawa T. The effect of bisphosphonate on bone formation after tooth extraction in ovariectomized rats. *J Hard Tiss Biol*. 2013; 22(4):493-500.

Young S, Bashoura AG, Borden T, Baggett LS, Jansen JA, Wong M, Mikos AG. Development and characterization of a rabbit alveolar bone nonhealing defect model. *J Biomed Mater Res A*. 2008; 86(1):182-94.

Zioupos P, Currey JD, Hamer AJ. The role of collagen in the declining mechanical properties of aging human cortical bone. *J Biomed Mater Res*. 1999;45(2):108-16.

ANEXOS

Anexo 1. Carta de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 16 de abril de 2015

Prezado Professor Eduardo Jorge Feres Filho

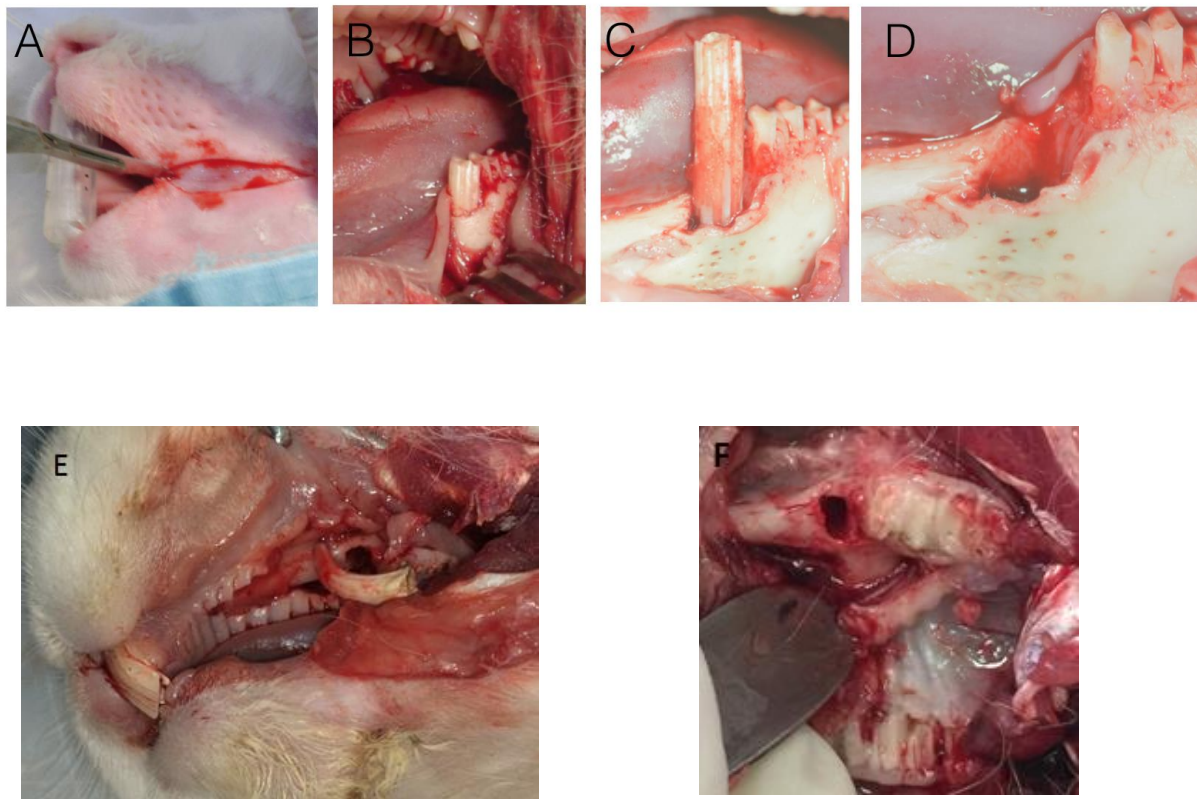
A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sobre o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto sob sua coordenação e intitulado: **“Estudo Comparativo Entre os Efeitos do Bifosfato (Alendronato) e do Ranelato de Estrôncio na Cicatrização Óssea Alveolar em Modelo de Coelhas Ovariectomizadas.”**, onde é prevista a utilização de **25 coelhos** foi aprovado por esta comissão no dia **18/03/2015**, sob o número de referência **007/15**.

Esta aprovação é válida somente para os 25 animais descritos, até o prazo de 16/04/2016.

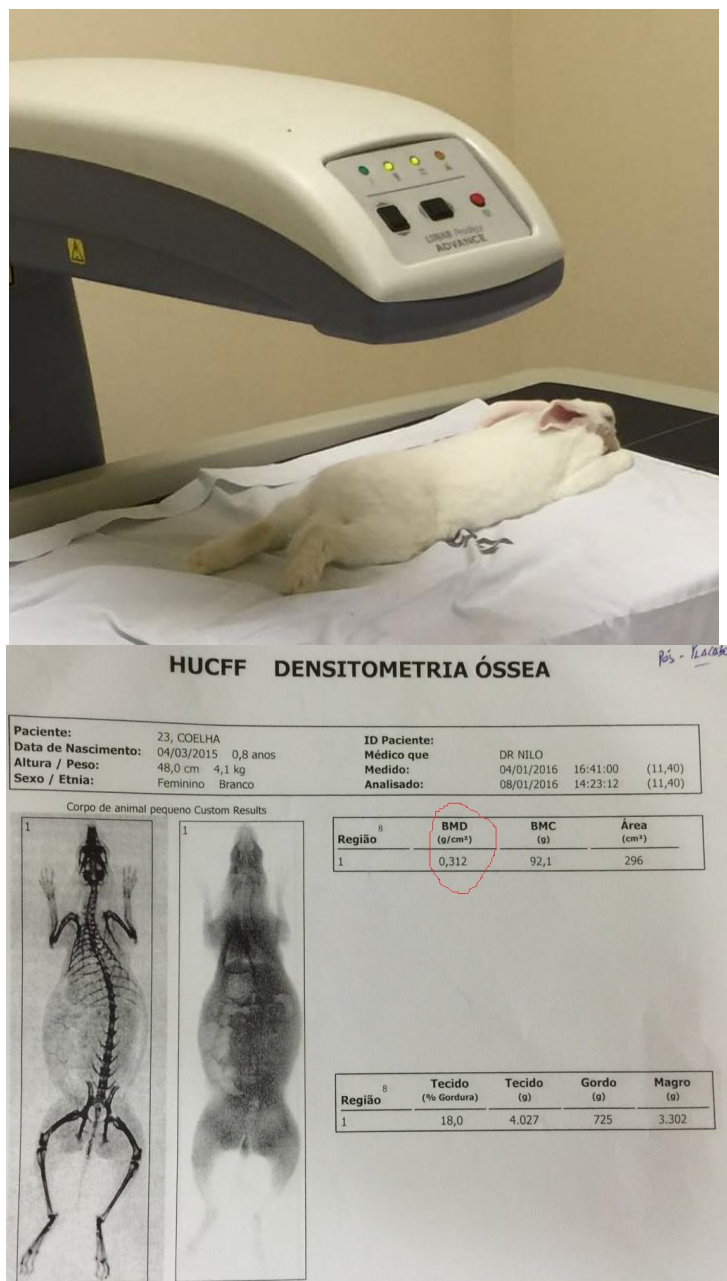
Atenciosamente;

Prof. Marcel Frajblat
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS

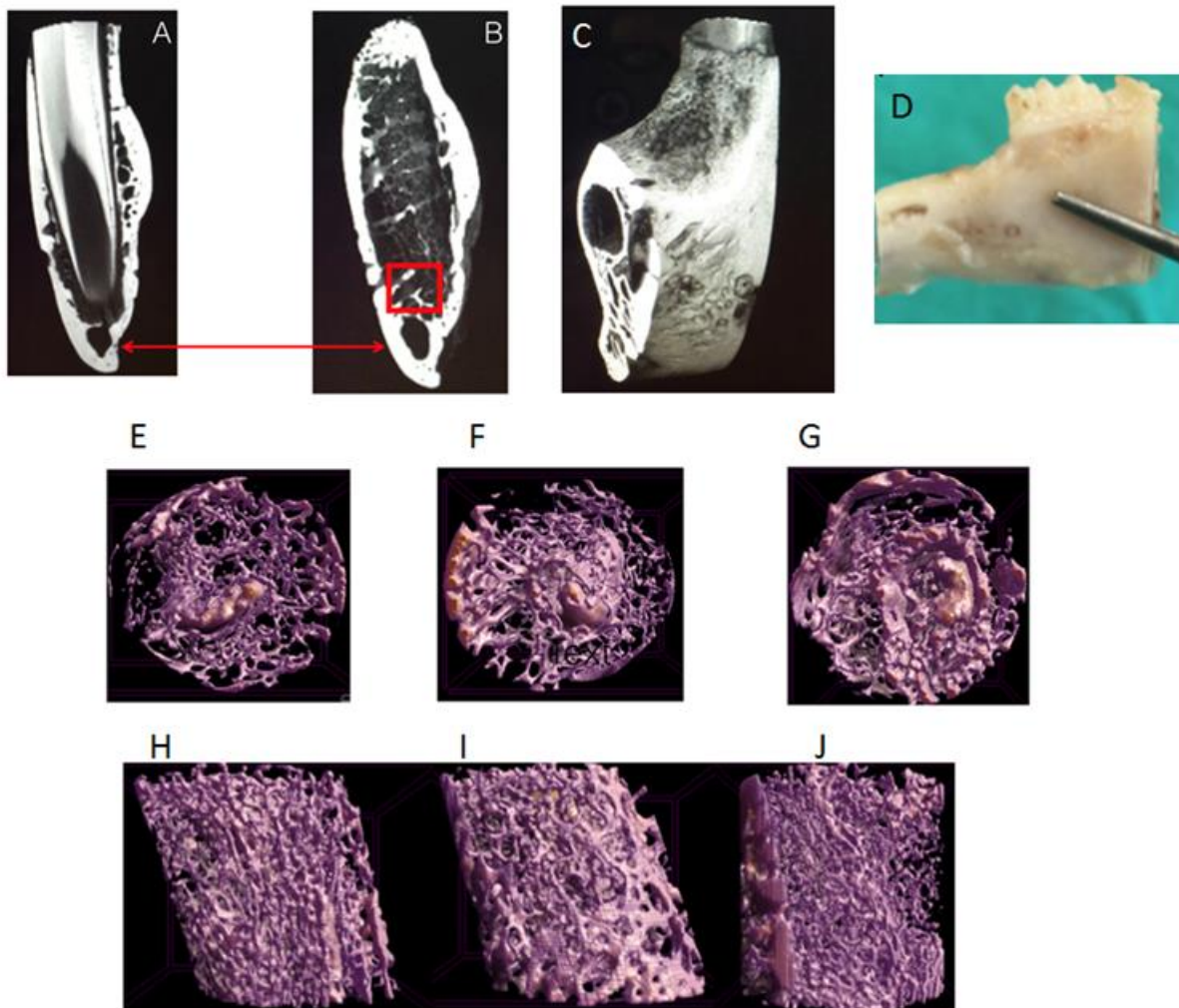
Anexo 2. Painéis de fotografias



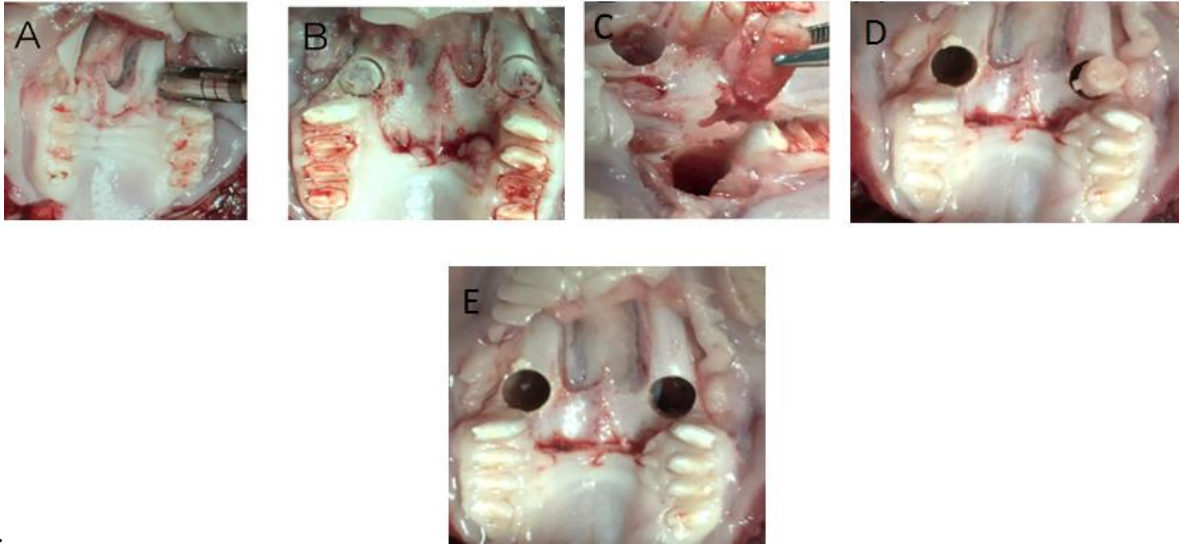
Painel 1. Fotos da sequência de procedimentos cirúrgicos de extração. A, acesso extra-oral, B, visualização do 1º pré- molar inferior, dente 34, a ser extraído; C, dente sendo removido do alvéolo. D, alvéolo dentário do dente 34 após a extração; E, extração do 1º pré- molar superior dente 24; F, alvéolo dentário do dente 24 após a extração.



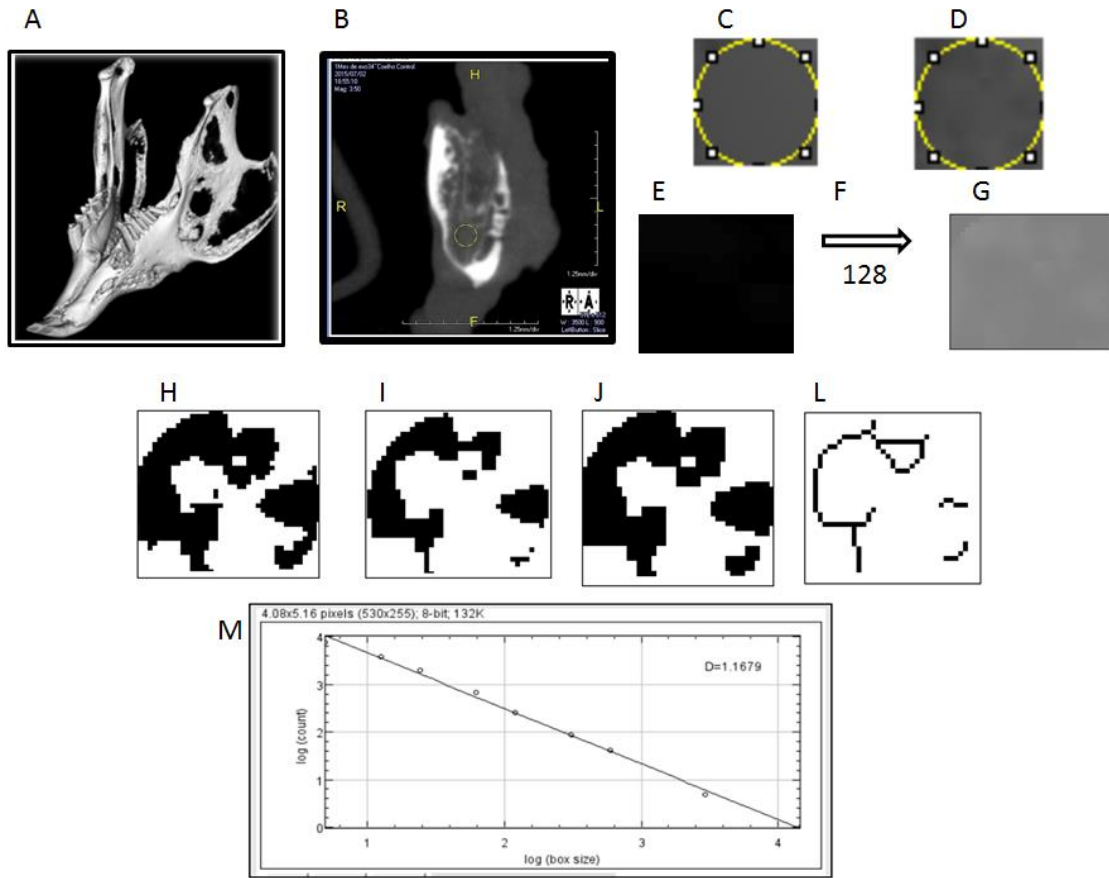
Painel 2. Densitometria óssea. A, animal posicionado para realização de densitometria. B, resultado da densitometria de uma coelha.



Painel 3. Ilustração da técnica de μ CT. Determinação do volume ósseo de interesse de 4mm^3 de osso trabecular acima do canal mandibular, excluindo as corticais e canal mandibular na imagem do plano sagital do alvéolo dentário com (A) e sem o dente (B); C, imagem do alvéolo cicatrizado; D, segmento mandibular da coelha com o alvéolo cicatrizado após exodontia do elemento #34. Imagens dos cortes transversos das áreas ósseas de interesse (AOI) com 10 semanas de cicatrização em E, OV+PL; F, SH+PL; G, OV+AL. Imagens dos cortes frontais da AOI com 04 semanas de cicatrização em H, OV+PL; I, SH+PL; J, OV+AL.



Painel 4. Fotografias clínicas sequenciais de procedimentos de coleta das amostras para HPLC. A, Broca trefina em posição de corte na área do alvéolo cicatrizado; B, Marcação da área do alvéolo cicatrizado com a broca trefina; C, Remoção do osso neoformado na região do dente 14; D, Remoção do osso neoformado na região do dente 24; E, Osso alveolar removido.



Painel 5. Análise Fractal. A, Imagem reconstruída da mandíbula total em tomografia computadorizada de feixes cônicos com a região do dente 34 em cicatrização após exodontia do mesmo; B, Reconstrução coronal do alvéolo dentário, com a seleção da região de interesse (ROI) assinalada no círculo amarelo logo acima do canal mandibular; C, imagem 1 da ROI com 50 x 50 pixels; D, imagem 2 da imagem 1 duplicada + filtro gaussiano 35 radius; E, imagem 3 da imagem 2 subtraída da imagem 1; F, adição de 128 da escala de cinza à imagem 3; G, imagem 4 da imagem 3 com 128 adicionado; H; imagem 5 da imagem 4 binarizada; I, imagem 6 da imagem 5 erodida; J, imagem 7 da imagem 6 dilatada; L, imagem 8 da imagem 7 esquelizada; M, imagem 9 do resultado final da dimensão fractal pelo “box counter”.