

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA
CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAIS**

Jéssica Cerioli Munaretto

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DO EFEITO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NA
ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR – ESTUDO EXPERIMENTAL EM
RATOS**

PORTO ALEGRE

2015

JÉSSICA CERIOLI MUNARETTO

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DO EFEITO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NA
ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR – ESTUDO EXPERIMENTAL EM
RATOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Clínica Odontológica/Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofaciais, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Clínica Odontológica.

Orientador: Profa. Dra. Deise Ponzoni

Linha de Pesquisa: Diagnóstico de Afecções Buco-faciais

PORTO ALEGRE

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M963a Munaretto, Jéssica Cerioli
 Análise histológica do efeito do ácido zoledrônico na
 articulação temporomandibular : estudo experimental em ratos /
 Jéssica Cerioli Munaretto. 2015.
 60 f. : il.

 Tese (Doutorado em Clínica Odontológica) – Faculdade de
 Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto
 Alegre, 2015.
 Orientador: Profa. Dra. Deise Ponzoni.

 1. Ácido zoledrônico. 2. Medicamentos – Efeitos
 colaterais. 3. Neoplasia óssea – Odontologia. 4. Neoplasia
 bucal. 5. Medicamentos – Reações adversas. I. Título. II.
 Ponzoni, Deise.

CDD 616.31

Bibliotecária Responsável: Deisi Hauenstein CRB-10/1479

JÉSSICA CERIOLI MUNARETTO

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DO EFEITO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NA
ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR – ESTUDO EXPERIMENTAL EM
RATOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Clínica Odontológica/Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofaciais, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Clínica Odontológica.

Porto Alegre, 18 de dezembro de 2015

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profª. Dra. Deise Ponzoni (UFRGS)
Doutora em CTBMF

Profª. Dra. Anna Christina Medeiros Fossati (UFRGS)
Doutora em Ciências /Biologia Celular e Tecidual

Profª. Dra. Adriana Corsetti (UFRGS)
Doutora em Clínica Odontológica/CTBMF

Profª. Dra. Nicole de Mello Rahde (PUCRS)
Doutora em Estomatologia Clínica

Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível e, de repente, estará fazendo o impossível.
São Francisco de Assis

À Profa. Dra. Edela Puricelli, pela idéia do trabalho, pela amizade, confiança, carinho e constante apoio a mim dedicados. Tenho orgulho e agradeço a oportunidade de integrar sua equipe. Agradeço pelos ensinamentos que me foram transmitidos durante todos esses anos.

À Sra. dedico este trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Deise Ponzoni, meu reconhecimento e gratidão por ter aceito este compromisso, pela amizade, conhecimento, confiança e disponibilidade durante as etapas de realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo auxílio nas minhas escolhas, e por uma vida repleta de alegrias e oportunidades.

Aos meus pais Hilário e Gelcy, ao meu esposo Fernando e à minha sogra Jane, pelo seu amor, paciência, incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos Gerson e Anderson, à minha cunhada Lisiane, sobrinhas Vitória e Lívia, agradeço o apoio permanente, mesmo que à distância.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia (PPGODO) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), na pessoa de seu coordenador, Prof. Dr. Cassiano Kuchenbecker Rösing, pelo empenho em oferecer um curso de pós-graduação de excelência.

Aos Professores Prof. Dr. Angelo Freddo, Prof. Dr. Carlos Eduardo Baraldi e Prof. Dr. Marcel Fasolo de Paris, pela amizade e aprendizado transmitido durante o curso.

À Profa. Dra. Anna Christina Medeiros Fossatti, Prof. Dr. Marcelo Lazzaron Lamers, Profa. Dra. Fernanda Visioli, Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho, ao colega Luciano Henrique de Jesus e demais colegas da área de Histologia e Patologia Bucal, pela disposição e gentil auxílio na leitura e captura das lâminas histológicas.

À minha colega Viviane Neves Pacheco, aos alunos da iniciação científica Matheus da Silva Müller e Cristina Comiotto pelo auxílio prestado na execução deste trabalho.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo financiamento desta pesquisa.

Às Professoras Dra. Nicole de Mello Rahde e Dra. Adriana Corsetti pela amizade e importante contribuição na avaliação da prova de qualificação.

A bibliotecária Deisi Hauensstein pela atenção e carinho com que revisou esse trabalho.

Ao Prof. Sérgio Kato, pela atenção, presteza e ajuda com a análise estatística.

Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-graduação em Odontologia, área de concentração em Clínica Odontológica, pelos ensinamentos transmitidos ao longo do curso.

Aos meus colegas, técnicos, assistentes e coordenadores do Instituto Puricelli e Associados da OdontoHosp e do Centro de Odontologia do Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, em especial à administradora Isabel Regina Pucci, pelo incentivo, companheirismo e amizade.

A todos os amigos que sempre estiveram comigo.

Meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE ABREVEATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

ATM	Articulação Temporomandibular
AZ	Ácido Zoledrônico
BMP ₂	Proteína morfogenética óssea ₂ (<i>Bone Morphogenetic Protein₂</i>)
C	Carbono
°C	Graus Celsius
CID	Código Internacional de Doenças
CO ₂	Dióxido de Carbono
CTX	Telopectídeo C-terminal
FAO	Fosfatase Alcalina Óssea
FDA	Agência norte-americana reguladora de medicamentos e alimentos (<i>Federal and Drug Administration</i>)
FPPs	Farnesil Difosfato sintetase
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HE	Hematoxilina e Eosina
ICC	Índice de Correlação Interclasse
IV	Intravenoso
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
mm	Milímetros
mm ²	Milímetros ao quadrado
NH ₂	Amina
OH	Hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Fósforo
PDT	Terapia fotodinâmica (<i>Photodynamic Therapy</i>)
pH	Potencial Hidrogênio
PRP	Plasma rico em plaquetas
PTH	Paratormônio
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
µm	Micrômetro

RESUMO

O ácido zoledrônico é um dos mais potentes inibidores da atividade osteoclástica disponível no mercado e amplamente prescrito pela equipe médica. A compreensão dos efeitos adversos dos medicamentos é essencial para a escolha da indicação do fármaco, inclusive para esclarecimento ao paciente dos riscos implicados, e para a prevenção destes efeitos. Contudo, uma associação causal entre o fármaco e seu efeito adverso poderá ser observada muitos anos após sua liberação. A literatura revisada apresenta um escasso número de publicações sobre o efeito do ácido zoledrônico sobre a articulação temporomandibular. Desta forma, esta pesquisa busca investigar este possível efeito avaliando diferentes estruturas da articulação temporomandibular de ratos. O presente trabalho compreende dois artigos científicos. O primeiro teve como objetivo realizar uma revisão de literatura sobre o ácido zoledrônico com o objetivo de informar o cirurgião-dentista sobre as principais características do fármaco, indicações, contra indicações, efeitos adversos e biomarcadores. O segundo artigo descreve o experimento da avaliação do efeito deste medicamento na articulação temporomandibular de ratos. A metodologia empregada nessa pesquisa permite concluir que o ácido zoledrônico exerce efeito sobre as articulações temporomandibulares de ratos, resultando em aumento das camadas de maturação e hipertrófica, não alterando o número de condrócitos e diminuindo a quantidade de colágeno do tipo I.

Palavras-chave: ratos, difosfonatos, articulação temporomandibular, cartilagem, histologia.

SUMÁRIO

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS	10
1.1 ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR	10
1.2 ÁCIDO ZOLEDRÔNICO	11
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 ARTIGO CIENTÍFICO 1	15
4 ARTIGO CIENTÍFICO 2	31
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
REFERENCIAS	52
APÊNDICE A – COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO INTRACLASSE	55
APÊNDICE B – ANÁLISE DOS DADOS	56
ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA	60

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

1.1 ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR

A articulação temporomandibular (ATM) é considerada uma das articulações mais complexas do corpo permitindo uma grande diversificação de movimentos, não somente de abertura e fechamento, mas também movimentos combinados de protrusão, retrusão, lateralidade. É uma diartrose bilateral, do tipo sinovial, que conecta a mandíbula à base do crânio (ÖBERG; CARLSSON; FAJERS, 1971; PAIVA, 2008).

Os ossos que compõem a articulação temporomandibular são a fossa glenóide (na superfície inferior da parte escamosa do osso temporal) e o côndilo mandibular (TEN CATE, 2008).

O côndilo mandibular, superfície articulante da mandíbula, é formado pela ossificação endocondral. É constituído por osso esponjoso recoberto por uma fina camada de osso compacto (VILLA; RODE, 1998). Possui a capacidade de crescimento multidirecional, e sua cartilagem pode se proliferar em qualquer combinação de direção, superior e posterior, de acordo com a necessidade de fornecer a melhor posição anatômica do arco mandibular (RAMIREZ-YAÑEZ, 2004).

A cartilagem condilar é composta por uma camada proliferativa de células progenitoras para o crescimento tecidual. Estruturalmente, apresenta quatro camadas distintas: a fibrosa, a proliferativa, a de maturação e a hipertrófica. A camada fibrosa suporta as forças transmitidas quando da função mandibular. A camada proliferativa é composta por células mesenquimais ou indiferenciadas e tem a capacidade de se diferenciar em fibroblastos, que formam a camada fibrosa, ou em condroblastos, isto é, as células cartilaginosa encontradas na cartilagem hialina. A camada de maturação é composta por condroblastos que sintetizam a matriz cartilaginosa - principalmente o colágeno tipo II. Os condroblastos aumentam de volume quando alcançam a última camada da cartilagem hialina, a camada hipertrófica. Essa área é conhecida como zona de ossificação endocondral (RAMIREZ-YAÑEZ, 2004; LUDER, 1998).

A cartilagem condilar é formada por dois tipos diferentes de cartilagem: fibrocartilagem e cartilagem hialina. O colágeno I é a principal proteína da fibrocartilagem, sendo encontrado também em torno das células hipertróficas, próximo à zona de ossificação endocondral (VILLA; RODE, 1995; LUDER, 1998).

A integridade destas superfícies fibrocartilaginosas é fundamental para manter a higidez da morfologia destes componentes ósseos, e sua modificação pode levar a alterações degenerativas (MARCHINI; SANTOS, 2011).

O potencial de adaptabilidade das superfícies articulares na articulação temporomandibular persiste na idade adulta e a camada condrogênica da cartilagem articular é a maior responsável pela renovação celular e remodelação, a qual responde a estímulos decorrentes de alterações na biomecânica articular (PURICELLI et al., 2012).

As articulações temporomandibulares estão sujeitas a uma dinâmica intensa, influenciada pela função muscular, pelo metabolismo ósseo e, principalmente, pela oclusão dentária. A desarmonia nas relações morfofuncionais: que envolvem os músculos mastigatórios, a articulação temporomandibular e estruturas anexas pode ser definida como uma desordem temporomandibular (OKESON, 2008).

A etiologia das desordens temporomandibulares tem sido objeto de extensa discussão na literatura odontológica, não havendo ainda um consenso sobre a mesma. Estudos revelam que a disfunção temporomandibular tem origem multifatorial, podendo esta estar associada a fatores predisponentes, fatores iniciadores e fatores perpetuantes. Traumas diretos e indiretos à articulação, hábitos parafuncionais, alterações esqueléticas, oclusais, sistêmicas ou locais e questões psicossociais podem estar associados, alterando o equilíbrio funcional do sistema estomatognático, caminhando, assim, em direção à disfunção e patologia (MARCHINI; SANTOS, 2011; OKESON, 2008; HUANG et al., 2002).

Segundo Huang et al. (2002) a remoção unilateral de dentes em coelhos promoveu diferenças entre os lados da ATM, espessamento da cartilagem condilar, e alterações dos núcleos na cartilagem condilar e disco. Esta atividade remodeladora devida à alterações oclusais foi descrita também na articulação temporomandibular de ratos.

1.2 ÁCIDO ZOLEDRÔNICO

Aprovado pela agência norte-americana reguladora de medicamentos e alimentos (*Federal and Drug Administration - FDA*) em 2002, o ácido zoledrônico (AZ) ou zolendronato é considerado um dos mais potentes bisfosfonatos nitrogenados de última geração (WIDLER et al., 2002; RUGGIERO et al., 2009).

É um fármaco com propriedades anti-reabsortivas e por isso tem sido amplamente prescrito para pacientes que apresentam uma importante atividade osteoclástica como hipercalcemia maligna, doença de Paget, doenças ósseas metastáticas e osteolíticas (RUGGIERO et al., 2009; RUSSEL et al., 2008; MARX et al., 2005).

São evidentes os benefícios clínicos do ácido zoledrônico, sobretudo para os pacientes com neoplasias ósseas. Além de inibir a reabsorção óssea, em diversos estudos clínicos, o ácido zoledrônico também suprimiu o crescimento tumoral e a angiogênese, e aumentou a sobrevida dos pacientes (RUGGIERO et al., 2009; BAGAM et al., 2009; RUGGIERO et al., 2006).

A compreensão dos efeitos adversos dos medicamentos é essencial para a escolha da indicação do fármaco, inclusive para esclarecimento ao paciente dos riscos implicados, e para a prevenção destes efeitos. Contudo, uma associação causal entre o fármaco e seu efeito adverso poderá ser observada muitos anos após sua liberação (RUSSEL et al., 2008).

Em 2003, a osteonecrose nos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos, em pacientes oncológicos, foi descrita pela primeira vez (MARX, 2003; MIGLIORATI et al., 2003; WANG; GOODGER; POGREL, 2003).

A osteonecrose associada ao uso de bisfosfonatos ocorre por uma combinação multifatorial. Na última década, o número de casos descritos na literatura tem aumentado (RUGGIERO et al., 2009; BAGAN et al., 2009; RUGGIERO et al., 2006; MIGLIORATI et al., 2010; VIDAL REAL et al., 2015). Pacientes que utilizam bisfosfonatos podem desenvolver a osteonecrose na maxila e/ou mandíbula em casos de processos infecciosos, traumatismos e, principalmente, quando submetidos a tratamentos odontológicos invasivos. (WANG et al., 2007; FLIEFEL et al., 2015).

O processo de reparo tecidual após procedimentos cirúrgicos intrabucais pode sofrer ação do ácido zoledrônico por meio da inibição da ação dos osteoclastos, redução da proliferação e migração de células epiteliais e do número de vasos sanguíneos (KOBAYASHI et al., 2010).

A maxila e a mandíbula são os ossos de eleição para o desenvolvimento da osteonecrose devido ao *turnover* ósseo constante, suscetibilidade a microtraumatismos frequentes e presença dos elementos dentários que constituem porta de entrada de microorganismos patogênicos via endodôntica ou periodontal. Além disso, imunossupressão, diabetes, obesidade, ingestão de bebida alcoólica, uso de medicamentos quimioterápicos, corticosteróides, têm sido considerados fatores de risco adjuvantes no processo de

desenvolvimento desta patologia (RUGGIERO et al., 2009; RUSSEL et al., 2008; RUGGIERO et al., 2006; ALLEN; BURR, 2009; LANDESBURG et al., 2011).

Em 2012, foi descrito um caso clínico de artrite supurativa na articulação temporomandibular associada ao uso de ácido zoledrônico, em um paciente com metástase óssea de neoplasia de próstata. De acordo com os autores, a via de infecção foi hematogênica (ENOMOTO et al, 2012).

A literatura revisada apresenta um escasso número de publicações sobre o efeito do ácido zoledrônico sobre a articulação temporomandibular. Desta forma, esta pesquisa busca investigar este possível efeito avaliando diferentes estruturas da articulação temporomandibular de ratos.

O presente trabalho compreende dois artigos científicos. O primeiro teve como objetivo realizar uma revisão de literatura sobre o ácido zoledrônico. O segundo artigo descreve o experimento da avaliação do efeito deste medicamento na articulação temporomandibular de ratos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do ácido zoledrônico sobre a articulação temporomandibular de ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são:

- a) revisar a literatura referente ao ácido zoledrônico;
- b) avaliar quantitativamente a espessura da cartilagem condilar, bilateralmente, e comparar com o grupo controle;
- c) avaliar quantitativamente o número de condrócitos no côndilo mandibular, em ambos lados, e comparar com o grupo controle;
- d) avaliar quantitativamente o número de fibras colágenas do tipo I geral nas estruturas da articulação temporomandibular (côndilo, disco articular região temporal articular) e, especificamente, nas regiões anterior, central e posterior do côndilo, bilateralmente, e comparar com o grupo controle.

3 ARTIGO CIENTÍFICO 1*

Ácido zoledrônico - o que preciso saber sobre este medicamento?

Zoledronic acid: I need to know about this medicine?

Jéssica Cerioli Munaretto¹, Deise Ponzoni², Edela Puricelli³

1- Aluna de Doutorado do Programa de Pós Graduação em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

2 - Professora associada do departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e chefe da Unidade de Cirurgia Bucomaxilofaciais/Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brasil

3- Professora titular de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacias da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e coordenadora técnica do Centro de Odontologia da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), Porto Alegre, RS, Brasil

Resumo

O ácido zoledrônico é um dos mais potentes inibidores da atividade osteoclástica disponível no mercado e amplamente prescrito pela equipe médica no tratamento de pacientes com doenças ósseo-metabólicas e de metástases ósseas. Considerando a possibilidade de efeitos adversos na cavidade bucal, esse artigo de revisão tem como objetivo informar o cirurgião-dentista sobre as principais características do fármaco, indicações, contra indicações, efeitos adversos e biomarcadores.

Palavras-chave: difosfanatos, revisão, odontologia, efeitos colaterais, reações adversas relacionadas a medicamentos.

Abstract

Zoledronic acid is one of the most potent inhibitors of osteoclastic activity commercially available and widely prescribed by the medical staff in the treatment of patients with metabolic bone - diseases and of bone metastases. Considering the possibility of adverse

* Artigo apresentado de acordo com as normas do periódico “Revista da Faculdade de Odontologia RFO” da Universidade de Passo Fundo. Qualis Odontologia B4 – Ano Base 2014.

effects in the oral cavity, this review article aims to inform the dentist about the main features of the drug, indications, contraindications, adverse effects and biomarkers.

Keywords: diphosphonates, review, dentistry, drug-related side effects, adverse reactions acid.

Introdução

Atualmente, o ácido zoledrônico é o bisfosfonato intravenoso mais utilizado no manejo e tratamento de diversas patologias osteolíticas, tendo sido administrado em mais de 850.000 pacientes com câncer no mundo todo. A abordagem do paciente pelo cirurgião-dentista deve obedecer a uma rotina de investigação que integre aspectos sobre possíveis patologias sistêmicas, uso de medicações e possíveis interações destas no tratamento odontológico.¹

Características do fármaco

O ácido zoledrônico, cujo nome químico é ácido 1-hidroxi-2imidazol-1-il-fosfonotil fosfônico monoidratado, também conhecido como zoledronato, é um bisfosfonato nitrogenado de terceira geração.^{2,3}

Os bisfosfonatos são substâncias quimicamente estáveis que apresentam efeitos farmacológicos. São obtidos, de forma sintética, a partir do pirofosfato inorgânico, onde um átomo de oxigênio ligado aos fosfatos é substituído por um átomo de carbono (P-C-P). Os dois grupos fosfonados promovem a ligação da molécula à matriz óssea e regulam a atividade de reabsorção óssea celular. A associação destes ao carbono central oferece maior resistência à hidrólise química e enzimática, não sendo convertidos em metabólitos no organismo.^{4,5}

De acordo com seu mecanismo de ação, o ácido zoledrônico é um bisfosfonato nitrogenado, ou seja, apresenta incorporação do grupo amina (NH_2) na cadeia lateral R2. As cadeias laterais R1 e R2 ligadas ao átomo de carbono são responsáveis pelos diversos meios de ação dos bisfosfonatos. Substitutos da cadeia R1 - como o grupo hidroxila (OH) - resultam num aumento da absorção do fármaco na matriz óssea, enquanto que a incorporação do grupo amina (NH_2) na cadeia R2 interfere na atividade bioquímica e na alteração da potência anti-reabsortiva.^{2,5}

Os bisfosfonatos que contêm nitrogênio - como o ácido zoledrônico - exercem seus efeitos celulares inibindo especificamente a enzima farnesil difosfato sintetase (FPPs) na via mevalonato. A interrupção deste mecanismo interfere na reabsorção óssea pois compromete o transporte vesicular intracelular e promove a apoptose celular, reduzindo a atividade osteoclástica.^{5,6}

A administração dos bisfosfonatos resulta em incapacidade dos osteoclastos de reabsorverem o osso. Além disso, tem um efeito antiangiogênico, ou seja, diminuição da formação de tubos capilares e conseqüente redução do número de vasos sanguíneos devido a sua ação agonista sobre os fatores de crescimento endoteliais.⁷

Há evidências de que os bisfosfonatos atuam sobre as estruturas arteriais diminuindo a deposição mineral e o acúmulo de colesterol, elastina e colágeno.⁴

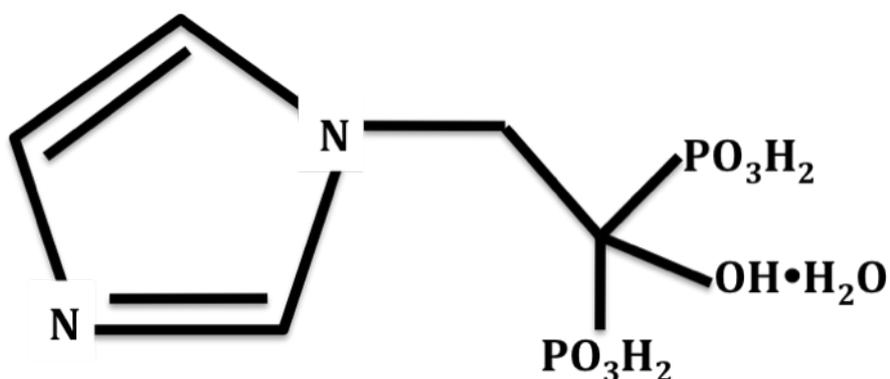


Fig 1. Estrutura química do ácido zoledrônico. Fonte autora, 2015.

O ácido zoledrônico foi aprovado pela agência norte-americana reguladora de medicamentos e alimentos (*Federal and Drug Administration - FDA*) em 2002. É um bisfosfonato nitrogenado, de terceira geração, com efeitos inibidores sobre a atividade de reabsorção óssea, 100 vezes a 10.000 vezes mais potente do que os bisfosfonatos de segunda e de primeira geração respectivamente.^{3,4,7,8}

A utilização do ácido zoledrônico em ratos e cães apresentou uma alta e persistente afinidade para o tecido ósseo, uma rápida eliminação da circulação e da maioria dos tecidos moles e acúmulo nos ossos, proporcionalmente à dose cumulativa, com tempo de retenção do fármaco no tecido ósseo extremamente elevado.^{5,9}

Administrado por via intravenosa, as concentrações plasmáticas máximas de ácido zoledrônico são atingidas no final da infusão. Os níveis sanguíneos diminuem rapidamente para menos de 10% em quatro horas e inferior a 1% em 24 horas após a infusão. Aproximadamente 61% da dose administrada é rapidamente absorvida pelo tecido ósseo, com tendência a localizar em áreas de aumento da taxa de *turnover*, e, em seguida, é lentamente libertado novamente para a circulação. Os 39% restantes são excretados de forma inalterada por filtração glomerular pelos rins.¹⁰

Indicações e contra indicações

O ácido zoledrônico está indicado no tratamento e manejo de condições relacionadas ao câncer, incluindo a hipercalemia maligna, complicações ósseas associadas às metástases ósseas em tumores sólidos, tais como câncer de mama, próstata, rim e pulmão, e de lesões osteolíticas como no mieloma múltiplo. Está indicado também no tratamento da doença de Paget, osteogênese imperfeita e osteoporose.^{5,11,12}

Está contraindicado para uso por gestantes, lactantes, em pacientes com hipersensibilidade significativa ao ácido zoledrônico, a outros bisfosfonatos ou a outros

componentes da formulação. Em função do longo período de retenção do fármaco nos ossos longos, pelo não estabelecimento da segurança e da eficácia do ácido zoledrônico em crianças, seu uso apenas será liberado para esta população quando o benefício se sobrepuser ao risco potencial.¹²⁻¹⁴

Nas indicações oncológicas, a apresentação do ácido zoledrônico (anidro), concentrado de 4mg/5ml para solução para infusão, é uma solução do fármaco, manitol e citrato de sódio em água para injeção. O manitol é usado como agente tonificante e o citrato de sódio para ajuste do pH, sendo esse em torno de 6. Nas indicações não oncológicas, a apresentação é de uma solução para infusão de 5mg/100ml de água para injeção.¹³⁻¹⁵

O ácido zoledrônico também tem sido alvo de estudo em grupos de pacientes com osteoporose. A administração desse medicamento para essa população foi liberada pela *FDA* em 2007 para aplicação de uma dose anual. No mesmo ano da liberação, um grande estudo prospectivo, randomizado, duplo cego, controlado por placebo avaliou 3889 pacientes que receberam uma dose anual de 5mg de ácido zoledrônico. A partir desse estudo ficou estabelecida a eficácia no controle da osteoporose em três anos de tratamento. Essa terapia reduziu em 70% o risco morfométrico de fratura comparado com o placebo. Apenas 2 casos de osteonecrose nos maxilares foi reportado, sugerindo um baixo risco nesta modalidade terapêutica.¹⁶ Outro ensaio clínico randomizado, duplo cego, controlado por placebo, com 181 mulheres acima de 65 anos de idade que apresentavam osteoporose, comparou o ácido zoledrônico com doses diárias de suplementação com cálcio e vitamina D. O estudo evidenciou que apenas uma dose de ácido zoledrônico de 5mg melhorou a densidade óssea mineral em mais de 2 anos. Entretanto, segundo os autores, mais pesquisas são necessárias para mudança na prática clínica já que, nesse estudo, não houve redução das taxas de fratura e mortalidade.¹⁷

Osteonecrose Associada ao uso do ácido zoledrônico

A osteonecrose avascular dos maxilares associada ao uso do ácido zoledrônico é um dos efeitos adversos deste medicamento. Há pouco mais de uma década, em 2003, a osteonecrose nos maxilares, associada ao uso de bisfosfonatos, foi descrita pela primeira vez numa série de 36 casos de pacientes oncológicos em uso de pamidronato ou ácido zoledrônico.¹⁸⁻²⁰ Em dezembro de 2004, mais de 200 casos foram reportados sobre esta patologia, a maioria como cartas ao editor, ou como uma série de casos.^{8,21} A partir daí, diversos casos têm sido descritos na literatura.^{11,22-24} De acordo com o Código Internacional de Doenças (CID), esta patologia pode ser classificada como CID M87.1 ou osteonecrose associada a drogas.²⁵

Esta patologia caracteriza-se pela presença de osso necrosado exposto na região maxilofacial, por mais de 8 semanas, em pacientes com o tratamento atual ou anterior com bisfosfonato e sem uma história de radioterapia nestas regiões.^{8,11, 26}

A osteonecrose associada ao uso de bisfosfonatos é modulada por fatores sistêmicos e locais. A administração endovenosa apresenta um risco maior para a ocorrência da osteonecrose associada ao uso de bisfosfonatos do que a administração oral.^{9,21} Outros fatores sistêmicos que influenciam são diabetes, desordens vasculares, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, hormônio (estrogênio), osteoporose (em pacientes oncológicos), desnutrição, tabagismo e uso do álcool, medicamentos anti-inflamatórios, esteróides, imunossupressores e drogas antiangiogênicas.^{1,21,27,28} Dentre os fatores locais relacionados à osteonecrose podemos citar a presença de processos infecciosos na cavidade bucal, história de trauma e procedimentos odontológicos invasivos envolvendo o tecido ósseo.^{6,28} A incidência e a gravidade desta patologia está correlacionada com a dose, modo de administração e duração do tratamento, principalmente no bisfosfonato de alta potência, nitrogenado, como o ácido zoledrônico intravenoso.^{11,26,29}

A fisiopatologia da osteonecrose relacionada com bisfosfonato ainda está em debate na literatura. Diferentes teorias têm sido descritas e tem sido proposta uma extensa lista de mecanismos. As duas hipóteses mais estudadas são a supressão da angiogênese e a remodelação óssea.³⁰ Aproximadamente 86% dos casos citados na literatura estão associados à extração dentária. O ácido zoledrônico, em ratos, reduz a proliferação e migração de células epiteliais e o número de vasos sanguíneos, interferindo, assim, no processo de reparo tecidual após extração dentária.³¹

A predileção da osteonecrose pelos maxilares tem gerado uma série de hipóteses tais como: a proximidade com o ambiente externo, separado apenas pelo epitélio escamoso estratificado com uma estreita camada subjacente da lâmina própria, favorecendo a exposição óssea na cavidade bucal frente à lesões na mucosa; a exposição frequente dos tecidos bucais à infecção bacteriana por meio da doença periodontal e periapical; *turnover* ósseo constante; e a resposta imune do hospedeiro.^{21,30-32}

Outra característica que distingue a mandíbula de outros ossos do esqueleto humana é pelo tipo de ossificação. A maxila e a mandíbula têm uma ossificação intramembranosa, diferentemente dos ossos longos e vértebras, que têm uma ossificação endocondral. O osso mandibular é mais denso do que qualquer outro osso no corpo humano, apresentando, em geral, um menor suprimento sanguíneo e, associado a diminuição do aporte sanguíneo provocada pela ação antiangiogênica dos bisfosfonatos, poderia explicar a predileção pela mandíbula no desenvolvimento da osteonecrose avascular.²²

A incidência de osteonecrose em pacientes com história de uso do ácido zoledrônico e que realizaram extração dentária variam de 1% a 11 % em pacientes com câncer de mama, de 3% a 17% em doentes com mieloma múltiplo, e 3% para 18% no câncer de próstata. A incidência de osteonecrose nos maxilares associada ao uso de zolendronato é igual a 0-

11,5% em terapias de até um ano de duração e 0-27,5% em terapias mantidas por entre 1 e 4 anos.³³

Uma revisão sistemática de 97 publicações no período de 2003 à 2014 avaliou um total de 4879 casos descritos na literatura de osteonecrose associada ao uso de bisfosfonatos. A média de idade dos pacientes foi de 66,5 anos. A patologia mostrou predileção feminina (2:1), tendo sua manifestação em 32,8% pacientes do sexo masculino e 67,2% do sexo feminino. Nas publicações que descreveram o local da osteonecrose, a mandíbula foi o local de maior prevalência (65,1%), seguido da maxila (28,5%) ou ambos os maxilares (6,4%). A indicação do uso do bisfosfonato estava associada ao tratamento de mieloma múltiplo (31,2%), câncer de mama (29,5%), osteoporose (19,6%), câncer de próstata (9,6%), metástase (2,5%), e outros cancros, incluindo o pulmonar, renal e carcinoma da bexiga (7,6%). A maioria dos pacientes apresentavam mieloma múltiplo e neoplasia óssea associada ao câncer de mama (60,7%). O tratamento com bisfosfonato por via intravenosa foi administrado em 3245 pacientes (83,2%). O ácido zoledrônico foi prescrito para 2427 (58,9%), 571 (13,9%) pacientes receberam o pamidronato, 523 (12,7%) pacientes receberam alendronato, 128 (3,1%) pacientes receberam ibandronato, e 469 (11,4%) pacientes receberam uma combinação bisfosfonatos.²⁸

De acordo com a gravidade, a osteonecrose dos maxilares pode ser classificada em quatro estágios. O estágio 0 (zero) corresponde à presença de esclerose óssea e risco de osteonecrose; o 1 à exposição e necrose óssea assintomática; o 2, à exposição e necrose óssea associada à dor e infecção; e o 3, à presença de tecido ósseo necrótico exposto, dor, infecção, fratura patológica, fístula extra-bucal e extensa osteólise.²¹ Considerando que o fármaco apresenta grande biodisponibilidade óssea, a interrupção do mesmo não assegura a melhora do quadro instalado.^{8,22,27} Quando presentes as exposições ósseas, a estratégia de cuidado envolve o uso de soluções antimicrobianas tópicas, analgésicos sistêmicos, sequestrostomia e

antibioticoterapia.^{1,8,23,34} Pacientes que desenvolvem infecções bucais necessitam de tratamento agressivo com regimes específicos de antibioterapia. A penicilina é o antibiótico de escolha e, para os pacientes alérgicos, a clindamicina ou quinolonas são opções terapêuticas. A prescrição de bochechos com água oxigenada 10 volumes, diluída em água filtrada (1:1) também tem sido realizada no intuito de auxiliar na remoção de detritos em áreas de exposição óssea.^{34,35} A intervenção cirúrgica deve ser realizada com cuidado e considerar os riscos de agravamento da patologia. O paciente deve estar ciente desta possibilidade.^{1,8,11} Nestes casos, a associação da terapia com oxigenoterapia hiperbárica, ozonioterapia ou até mesmo novas tecnologias como a laserterapia de baixa intensidade também tem sido recomendada, podendo estar associada a terapia fotodinâmica (PDT).^{1,28,35} Além disto, o uso da teriparatida, de fatores de crescimento (plasma rico em plaquetas (PRP) ou proteína morfogenética óssea 2 (BMP₂), o desbridamento guiado por fluorescência e a terapia de ultrassom também têm sido reportados na literatura como terapias adjuvantes no manejo desta patologia.²⁸

Recentemente foi publicado um estudo que acompanhou e avaliou 194 pacientes que receberam terapia com ácido zoledrônico durante um período de 7 anos (2006-2013). Da população total do estudo de pacientes submetidos a terapia IV bisfosfonatos, 14 homens (7,2%) e 11 mulheres (5,7%) apresentaram osteonecrose, sendo que 17 não haviam realizado extrações dentárias prévias. As áreas mais afetadas por osteonecrose foram a mandíbula (50%), seguido da maxila, e em uma menor percentagem (16%), em ambos os maxilares. Em relação ao período de início da terapia com bisfosfonato e o aparecimento das lesões, a área de exposição óssea exposta começou a aparecer após um ano. O número de pacientes afetados e a agressividade da doença aumentou significativamente três anos após o início do tratamento. Do total, 24 % dos pacientes sofreram de exposição óssea durante o primeiro ano de tratamento, 32 % em 2-3 anos, e 44 % a partir de 3 anos de

tratamento. Diante dos resultados expostos, os autores recomendam que todos os pacientes que serão submetidos ao uso do ácido zoledrônico passem previamente, por uma rigorosa avaliação odontológica e orientação de cuidados com a higiene bucal, devendo manter um controle periódico preventivo com especial atenção aos maxilares, no intuito de detectar precocemente possíveis focos de infecção e trauma nesta região.²⁴

Na Alemanha, o serviço de dados nacional de farmacovigilância registrou, no período de 8 anos (2004-2012), 1.229 casos de pacientes com diagnóstico validado de osteonecrose associada ao uso de bisfosfonato. Destes, foram considerados apenas os casos de pacientes oncológicos em uso de terapia com bisfosfonato intravenoso. Dos 963 pacientes incluídos no estudo, 780 pacientes (81%) apresentaram osteonecrose durante o tratamento com ácido zoledrônico, num período médio de 2 anos.²⁹

Na Escandinávia, um estudo de coorte está sendo realizado para registrar todos os casos de osteonecrose associada ao uso de bisfosfonato provenientes da Dinamarca, Noruega e Suécia, entre 2011 e 2019. O objetivo inicial da coorte é apoiar um estudo de farmacovigilância contínua do uso do Denosumab e do ácido zoledrônico nesta região. Foi criada uma rede para relatar os casos de incidência desta patologia num banco de dados de pesquisa nos três países, com as suas 199 clínicas, departamentos e unidades de cirurgia oral e maxilofacial, independentes e de base hospitalar. Além de fornecer informações de segurança, o estudo pretende, a longo prazo, servir como uma ferramenta de pesquisa para a identificação de fatores de risco, avaliar os resultados do tratamento e prognóstico da osteonecrose associada ao uso destes medicamentos, permitindo o desenvolvimento de melhores cuidados baseados em evidência.³⁶

Biomarcadores

Biomarcadores, como o telopeptídeo amino-terminal do colágeno tipo I (CTX), o

hormônio da paratiróide (PTH) e a fosfatase alcalina óssea (FAO), são alguns dos biomarcadores que têm sido usados na avaliação dos níveis de reabsorção e aposição óssea no organismo humano. São indicados para a monitorização do efeito da terapia por bisfosfonato, previsão da perda óssea e ocorrência de fraturas, bem como para o acompanhamento da progressão e envolvimento ósseo na patologia. Esses têm sido propostos, na literatura, como potenciais preditivos do prognóstico para o desenvolvimento da osteonecrose previamente aos procedimentos cirúrgicos na cavidade bucal. Entretanto, o conhecimento destes biomarcadores, como testes preditivos na osteonecrose ainda é pequeno e não há um consenso sobre seu valor clínico.³⁷

Considerações Finais

O ácido zoledrônico, um bisfosfonato de terceira geração vem sendo utilizado no tratamento de patologias osteolíticas e os seus benefícios são amplamente reconhecidos na literatura. Contudo, um dos mais importantes efeitos adversos é a osteonecrose dos maxilares. O cirurgião-dentista deve estar atento à possibilidade de uso desse medicamento, principalmente em pacientes com história de mieloma múltiplo, doença de Paget, neoplasias de mama, próstata e outros órgãos sólidos, com metástases ósseas e, até mesmo, de osteoporose. Perguntas claras e direcionadas para investigar o uso deste fármaco devem ser realizadas na anamnese. O acompanhamento odontológico prévio, durante e após o uso do ácido zoledrônico, bem como a educação em saúde devem fazer parte de uma estratégia para prevenir e monitorar o desenvolvimento de complicações. Os pacientes devem ser esclarecidos sobre os riscos da osteonecrose associada ao uso do ácido zoledrônico, já que as terapias descritas na literatura podem auxiliar apenas, em alguns casos, numa melhora da qualidade de vida, porém sem perspectivas de cura.

Referências

1. 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.
2. Rodan AG. Mechanisms of action of bisphosphonates. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1998; 38:375-88.
3. Widler L, Jaeggi KA, Glatt M, Muller K, Bachmann R, Bisping M, et al. Highly potent geminal bisphosphonates: from pamidronate disodium (Aredia) to zoledronic acid (Zometa). *J Med Chem.* 2002;45(17):3721-38.
4. Fleisch H. Bisphosphonates in bone disease: from the laboratory to the patient. 2nd ed. London: Parthenon Publishing Group; 1995. v. 1.
5. Russel RGG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int.* 2008;19(1):733–759.
6. Wang EP, Kaban LB, Strewler GJ, Raje N, Troulis MJ. Incidence of osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma and breast or prostate cancer on intravenous bisphosphonate therapy. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65(7):1328-31.
7. Green J. Zoledronate: the preclinical pharmacology. *Br J Clin Pract Symp Suppl.* 1996;87:16-8, discussion 22.
8. Migliorati CA, Casiglia J, Epstein J, Jacobsen PL, Siegel MS, Woo SB. Managing the care of patients with bisphosphonate osteonecrosis: An América Academy of Oral Medicine position paper. *J Am Dent Assoc.* 2005;136(12):1658-68.
9. Green JR. Zoledronic acid: pharmacologic profile of a potent bisphosphonate. *J Organomet Chem.* 2005; 690(10): 2439-48.

10. Perazella MA, Markowitz GS. Bisphosphonate nephrotoxicity. *Kidney Int.* 2008;74(11):1385-93.
11. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws--2009 update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(5 Suppl):2-12.
12. De Luca A, Lamura L, Gallo M, Daniele G, D'Alessio A, Giordano P, et al. Pharmacokinetic evaluation of zoledronic acid. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2011;7(7):911-8.
13. Graham R, Russell G. Bisphosphonates: mode of action and pharmacology. *Pediatrics.* 2007; 119 Suppl 2:S150-62.
14. Roldan CJ, Paniagua L. Complications of New Medications. *West J Emerg Med.* 2015;16(1):154-6.
15. Mehrotra B, Ruggiero S. Bisphosphonate complications including osteonecrosis of the jaw. *Am Soc Hematol.* 2006; 356-60.
16. Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, et al. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med.* 2007;356(18):1809-22.
17. Greenspan SL, Subashan P, Ferchak MA, Nace DA, Resnick NM. Efficacy and safety of single-dose zoledronic acid for osteoporosis in frail elderly women: a randomized clinical trial. *JAMA Intern Med.* 2015;175(6):913-21.
18. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003;61(9):1115-7.
19. Migliorati CA. Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis. *J Clin Oncol.* 2003;21(22):4253-4.

20. Wang J, Goodger NM, Pogrel MA. Osteonecrosis of the jaws associated with cancer chemotherapy. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003;61(9):1104-7.
21. Ruggiero SL, Gralow J, Marx RE, Hoff AO, Schubert MM, Hurn JM, et al. Practical guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with cancer. *J Clin Oncol Pract.* 2006; 2(1):7-14.
22. Migliorati CA, Woo SB, Hewson I, Barasch A, Elting LS, Spijkervet FK, et al. A systematic review of bisphosphonate osteonecrosis (BON) in cancer. *Support Care Cancer.* 2010;18(8):1099-106.
23. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw: 2014 Update [monograph online]. AAOMS; 2014. [cited 2015 Nov 4]. Available from: URL: http://www.aaoms.org/docs/position_papers/mronj_position_paper.pdf?pdf=MRONJ-Position-Paper.
24. Vidal-Real C, Pérez-Sayáns M, Suárez-Peñaranda J-M, Gándara-Rey J-M, García-García A. Osteonecrosis of the jaws in 194 patients who have undergone intravenous bisphosphonate therapy in Spain. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2015;20(3):e267-e272.
25. Organização Mundial da Saúde. Classificação estatística internacional de doenças e problemas relacionados à saúde: CID-10 [monograph online]. Brasília: OMS; 2008. [cited 2015 Nov 15]. Available from: URL: http://www.datasus.gov.br/cid10/V2008/WebHelp/m86_m90.htm.
26. Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res.* 2007;22(10):1479-91.
27. Marx RE, Cillo JE, Ulloa JJ. Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *Am Assoc Oral*

Maxillofac Surg. 2007;65(12):2397-410.

28. Fliefel R, Tröltzsch M, Kühnisch J, Ehrenfeld M, Otto S. Treatment strategies and outcomes of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) with characterization of patients: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015;44(5):568-85.

29. Gabbert TI, Hoffmeister B, Felsenberg D. Risk factors influencing the duration of treatment with bisphosphonates until occurrence of an osteonecrosis of the jaw in 963 cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2015;141(4):749-58.

30. Allen MR, Burr DB. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: So many hypotheses, so few data. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(5 Suppl):61-70.

31. Kobayashi Y, Hiraga T, Ueda A, Wang L, Matsumoto-Nakano M, Hata K, et al. Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice. *J Bone Miner Metab.* 2010;28(2):165-75.

32. Landesberg R, Woo V, Cremers S, Cozin M, Marolt D, Vunjak-Novakovic G, et al. Potential pathophysiological mechanisms in osteonecrosis of the jaw. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1218:62-79.

33. Kühl S, Walter C, Acham S, Pfeffer R, Lambrecht JT. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a review. *Oral Oncol.* 2012;48(10):938-47.

34. Capelari MM, Zillioto T, Marzola C, Toledo Filho JL, Pastori CM, Toledo GL, et al. Osteonecrose dos maxilares associada à bisfosfonatos [monograph online]. Bauru: Associação paulista de Cirurgiões-Dentistas; 2010. [cited 2013 Jun 10]. Available from: URL: http://www.actiradentes.com.br/revista/2010/textos/26RevistaATO-Osseo_necrose_dos_maxilares-2010.pdf.

35. Munaretto JC, Fogliatto L, Franco, FC, Langie R. Cuidados do atendimento odontológico do paciente com doenças onco-hematológicas. In: Morais TM, Silva A,

organizadores. Fundamentos da odontologia em ambiente hospitalar/ UTI. São Paulo: Esevier; 2015. p. 257-68.

36. Schiodt M, Larsson Wexell C, Herlofson BB, Giltvedt KM, Norholt SE, Ehrenstein V. Existing data sources for clinical epidemiology: Scandinavian Cohort for osteonecrosis of the jaw: work in progress and challenges. *Clin Epidemiol.* 2015;7:107-16.

37. Lazarovici TS, Mesilaty-Gross S, Vered I, Pariente C, Kanety H, Givol N, et al. Serologic bone markers for predicting development of osteonecrosis of the jaw in patients receiving bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010; 68(9):2241-7.

4 ARTIGO CIENTÍFICO 2[†]

ANÁLISE HISTOLÓGICA DO EFEITO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR – ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

HISTOLOGICAL ANALYSIS OF THE EFFECT OF ZOLEDRONIC ACID IN THE TEMPOROMANDIBULAR JOINT: AN EXPERIMENTAL STUDY IN RATS

Jéssica Cerioli Munaretto¹, Deise Ponzoni¹, Edela Puricelli¹

1- Unidade de Experimentação Animal, Unidade Experimental de Patologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal Do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil.

RESUMO

O ácido zoledrônico tornou-se uma alternativa no controle e tratamento de uma variedade de doenças ósseas. Em virtude do escasso conhecimento sobre a repercussão do uso de bisfosfonatos sobre a articulação temporomandibular, este trabalho propõe-se a avaliar o efeito do ácido zoledrônico em estruturas da articulação temporomandibular de ratos. Para realização desta pesquisa foram utilizadas amostras provenientes do estudo realizado por Pacheco *et al.* (2015). A amostra foi composta por 28 articulações temporomandibulares de 14 ratos *Wistar*, com 60 dias e peso médio de 250 g divididos em 2 grupos (teste e controle), subdivididos em lado direito e esquerdo. Os animais do grupo teste receberam uma dose de 0,2 mg/Kg de ácido zoledrônico, via intraperitoneal, semanalmente, por 3 semanas, e o grupo controle recebeu dose equivalente de soro fisiológico. Todos os animais foram submetidos à extração dentária do primeiro molar superior esquerdo e defeito na coroa dentária do

[†] Artigo apresentado de acordo com as normas do periódico *International Journal of Experimental Pathology* (Qualis Odontologia A2 – Ano Base 2014, fator de impacto 2.168).

primeiro molar inferior ipsilateral. Os procedimentos dentários foram realizados após o término da aplicação do fármaco. Os animais foram mortos em 8 semanas. A análise histológica avaliou a espessura das camadas da cartilagem condilar, o número de condrócitos na camada hipertrófica e a quantificação de colágeno tipo I na área correspondente às estruturas da articulação temporomandibular (côndilo, temporal e disco articular) e especificamente nas regiões anterior, central e posterior do côndilo mandibular. Os resultados mostraram na avaliação da espessura das camadas de cartilagem, que a média da espessura da camada de maturação no côndilo esquerdo foi significativamente maior no grupo teste do que no grupo controle ($p=0,016$). Na camada hipertrófica, independente do lado, o grupo teste apresentou média de espessura significativamente maior do que no grupo controle ($p=0,004$). Não houve diferença significativa na avaliação das médias do número de condrócitos entre os grupos teste e controle em ambos os lados ($p>0,05$). Na quantificação do colágeno tipo I na região posterior do côndilo, no grupo controle, foi significativamente maior no lado esquerdo do que no lado direito ($p=0,007$). A quantidade de colágeno tipo I em geral, ou seja, no côndilo, disco e estrutura temporal articular, no grupo teste foi significativamente menor no lado direito do que no lado esquerdo ($p=0,014$). O côndilo do lado direito apresentou valores significativamente menores no grupo teste em comparação ao grupo controle ($p=0,035$). Com base nos resultados pode-se concluir que o ácido zoledrônico exerce efeito sobre as articulações temporomandibulares de ratos.

Palavras-chave: ratos, difosfonatos, articulação temporomandibular, cartilagem, histologia.

ABSTRACT

The zoledronic acid it is an alternative for the control and treatment of a variety of bone diseases. This paper proposes to evaluate the effects of zoledronic acid in rat temporomandibular joint structures. Samples were used from the study by Pacheco *et al.*

(2015). The sample consisted of 28 temporomandibular joints of 14 Wistar rats, 60 days and weighing 250g divided into 2 groups (control and test) divided into right and left. The animals of the test group received a dose of 0.2 mg / kg zoledronic acid, intraperitoneally weekly for 3 weeks and the equivalent of dose control group of normal saline. All animals were submitted to dental extraction of the maxillary left first molar and dental crown defect in the lower first molar ipsilateral. Dental procedures were carried out after completion of the application of the drug. The animals were sacrificed at 8 weeks. Histological analysis evaluated the thickness of the layers of the condylar cartilage, the number of chondrocytes in hypertrophic layer, and the quantification of collagen type I on the area corresponding to the structures of the temporomandibular joint (condyle, temporal and articular disc) and specifically in the anterior, central and posterior mandibular condyle. The results shown in the assessment of the thickness of the cartilage layer is observed that the average thickness of the layer in the maturation left condyle was significantly higher in test group than in control group ($p = 0.016$). In independent hypertrophic layer side the test group had significantly greater average thickness than in the control group ($p = 0.004$). There was no significant difference in the evaluation of the mean number of chondrocytes between the test and control groups on both sides ($p > 0.05$). In the quantification of type I collagen in the region of the condyle in the control group it was significantly higher on the left than on the right side ($p = 0.007$). The amount of type I collagen in general, ie the condyle disk and the temporal joint structure in the test group was significantly lower on the right side than the left side ($p = 0.014$). The condyle on the right side showed significantly lower in the test group compared to the control group ($p = 0.035$). Based on the results it can be concluded that zoledronic acid exert any effect on the temporomandibular joints of rats.

Keywords: rats, diphosphonates, temporomandibular joint, cartilage, histology.

INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos são agentes anti-reabsortivos do osso, tradicionalmente utilizados nos tratamento de doenças ósseo-metabólicas e de metástases ósseas. Entre os mais utilizados, por via endovenosa, destaca-se um bisfosfontato nitrogenado, o ácido zoledrônico (Fleisch 1995; Russel *et al.* 2008; Bagan *et al.* 2009; Gabbert *et al.* 2015).

Possíveis efeitos secundários à administração do ácido zoledrônico têm sido reportados na literatura. São descritos desde casos de situação semelhante a estágio gripal inicial quando administrada a primeira infusão, febre, fadiga, arrepios, artralgia, mialgia, náusea, vômito, insuficiência renal em pacientes com câncer após infusões de altas doses repetitivas até disgeusia, parestesia e osteonecrose nos maxilares (Mehrotra & Ruggiero, 2006).

O efeito do ácido zoledrônico na articulação temporomandibular tem sido alvo de pesquisas recentes (Camacho *et al.* 2013; Renders *et al.* 2014; Tatli *et al.* 2014).

Um estudo experimental em ratos comparou o efeito do ácido zoledrônico, via intraperitoneal, em diferentes doses (0,2mg, 0,4mg e 0,6mg) quanto à resistência à fratura do côndilo mandibular. A dose de 0,2mg foi administrada semanalmente, durante 3 semanas e a morte dos animais foi realizada 28 dias após a administração da última dose. A resistência à fratura foi medida (em Newtons) com uma máquina universal de ensaios. Os espécimes foram observados sob um microscópio eletrônico de varredura e submetidos à análise química elementar e mapeamento da composição mineral óssea por espectrometria de energia dispersiva e raio-x. Como resultado, houve diferença estatística significativa quanto ao aumento da resistência à fratura com a maior dose acumulada do fármaco no grupo teste. Os autores observaram também um aumento dos níveis de cálcio e fósforo diretamente proporcional a dose administrada (Camacho *et al.* 2013).

Outro estudo experimental em camundongo com 3 meses de idade, avaliou o efeito de 0,5mg/kg de ácido zoledrônico no côndilo mandibular. O fármaco foi administrado semanalmente, pela via intraperitoneal durante 30, 90 e 180 dias. Foram realizadas avaliações por microtomografia e histomorfometria. Os resultados mostraram que no grupo teste houve um aumento na densidade (dose-dependente) de mineralização óssea. Entretanto, na análise histológica do grupo que recebeu maior quantidade do fármaco, não houve a presença de um tecido ósseo maduro, mas sim uma região cartilaginosa com um baixo nível de mineralização descrita pela baixa mineralização na camada hipertrófica. Após o tratamento com ácido zoledrônico houve um aumento na espessura da camada hipertrófica ao longo do tempo. Os autores atentam que os dados poderiam indicar a possibilidade de efeitos adversos negativos no desenvolvimento em adultos jovens submetidos ao tratamento com o ácido zoledrônico (Renders *et al.* 2014).

Em um estudo experimental em coelhos, foi avaliado o efeito de uma única aplicação de 0,1mg/kg de ácido zoledrônico, via intravenosa por bomba de infusão, sobre a remodelação óssea fisiológica e microarquitetura do côndilo mandibular. Os animais foram mortos em 21 dias após a administração do fármaco. Os autores observaram que o ácido zoledrônico, na análise radiográfica, propiciou um aumento significativo na mineralização do côndilo mandibular e, histologicamente, um aumento na mineralização óssea e na espessura da camada óssea trabecular (Tatli *et al.* 2014).

Baseado na literatura consultada e no fato de que poucos são os estudos que avaliam o efeito do ácido zoledrônico na articulação temporomandibular, este trabalho propõe-se a avaliar o efeito do ácido zoledrônico nesta articulação, utilizando como modelo experimental, o rato.

METODOLOGIA

Para este estudo foi realizado o aproveitamento de material biológico de parte da pesquisa de dissertação de mestrado intitulada: Terapia por bisfosfonato nitrogenado: avaliação, em ratos, da estrutura alveolar após exodontia, da aluna de mestrado do Programa de Pós-graduação em Odontologia, Viviane Neves Pacheco, sob a orientação da Profa. Dra. Deise Ponzoni, tendo sua aprovação registrada no protocolo de número 120108, pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA. A metodologia utilizada segue transcrita.

Delineamento do Estudo

Este estudo utilizou um desenho experimental do tipo prospectivo, randomizado, controlado, cego, em modelo animal.

Descrição da amostra

A amostra foi composta por 14 ratos, heterogênicos, da espécie *Rattus norvegicus albinus*, cepa *Wistar*, machos, clinicamente sadios com idade média de 60 dias e peso médio de 250 gramas. Os animais foram divididos, de forma randomizada, em dois grupos (teste e controle), sendo avaliadas estruturas da articulação temporomandibular bilateralmente (direita e esquerda). Os animais do grupo teste receberam ácido zoledrônico e os animais do grupo controle tiveram a administração de soro fisiológico. Todos os animais receberam intervenção nos primeiros molares superior e inferior no lado esquerdo (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição dos grupos do estudo.

Grupos	Distribuição de animais por grupo	ATM direita	ATM esquerda	Administração ácido zoledrônico (AZ)	Tempo de administração do AZ (semanas)	Tempo de observação (semanas)
Controle	n= 07	n= 07	n= 07	não	--	08
Teste	n= 07	n= 07	n= 07	sim	03	08

Fonte autora, 2015.

Procedimentos prévios

O bisfosfonato empregado por Pacheco (2015) foi o ácido zoledrônico, por via intraperitoneal, com seringa de insulina. A frequência de administração do fármaco foi de uma dose de 0,2mg/kg semanal, por 3 semanas, totalizando 0,6mg/kg total do fármaco. O grupo controle recebeu a dose equivalente de soro fisiológico.

Para administração do fármaco, não foi realizada anestesia. O animal foi contido através da colocação da mão sobre o dorso e a caixa torácica, e a cabeça apreendida entre o polegar e o indicador, imediatamente atrás da mandíbula. A pesagem dos animais para cálculo das dosagens foi realizada sete dias previamente à administração do fármaco.

Todos os animais incluídos nesse estudo foram submetidos a procedimento cirúrgico para remoção do primeiro molar superior esquerdo e defeito com broca esférica (número ¼) na coroa dentária do primeiro molar inferior esquerdo, simulando uma cavidade de cárie com envolvimento pulpar, após a administração da terceira dose do ácido zoledrônico, aos 21 dias. Durante todo o período do experimento, os animais foram mantidos nas dependências da Unidade Experimental Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em temperatura ambiente de 23°C (mais ou menos um grau); alimentados com ração comercial e água *ad libitum*, e foram submetidos a exames veterinários para a exclusão de qualquer patologia concomitante, que poderia interferir com os resultados do presente trabalho.

Morte e Preparo dos animais

Decorrido o tempo de oito semanas, a partir do início do estudo, 35 dias após os procedimentos cirúrgicos, foram realizadas as mortes dos animais seguindo os critérios da Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), através da utilização de câmara de CO₂, com o intuito de preservar as estruturas a serem examinadas. Imediatamente após a morte, foi realizada a necropsia com a remoção completa do crânio e hemissecção do mesmo, separando os lados direito e esquerdo com uma um disco metálico acoplado a um mandril em um motor cirúrgico.

As peças operatórias correspondentes à região da articulação temporomandibular, direita e esquerda, foram colocadas imediatamente em recipientes plásticos devidamente identificados, fixadas e conservadas em formalina neutra tamponada a 10%, com a finalidade de evitar as alterações *post mortem*.

Análise Histológica

Os procedimentos de confecção das lâminas e de análise histológica foram realizados na Unidade de Patologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre/UFRGS.

Para este estudo, foram incluídas 28 articulações temporomandibulares. Após a fixação das peças em formalina tamponada as mesmas foram descalcificadas em uma solução de ácido nítrico⁵ a 10%. As peças foram processadas e incluídas em parafina, resultando em um bloco para cada articulação. De cada bloco, foram obtidos dois cortes histológicos, cada um deles com 4µm de espessura e confeccionadas as respectivas lâminas histológicas. Houve perda no processamento de uma articulação temporomandibular lado direito do grupo teste. Foram analisadas 27 articulações temporomandibulares.

⁵ FM GOLD (Ácido Nítrico 65%), F. Maia Indústria e Comércio Ltda, Cotia, SP, Brasil.

Cegamento

A leitura das lâminas foi realizada por três pesquisadores cegos. As lâminas foram codificadas por um indivíduo externo à análise, de modo que os examinadores não sabiam a que grupo cada lâmina pertencia.

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi avaliada ao longo do estudo, onde 10 lâminas foram sorteadas e reavaliadas após um período de 10 dias, por todos os examinadores. O teste utilizado foi o Coeficiente de Correlação Intraclasse (ICC), onde o valor mínimo aceito foi de 0,804, mostrando uma excelente concordância intra e inter examinador (tabela no apêndice A).

Análise dos dados

Para a medição da espessura da cartilagem condilar e quantificação do número de condrócitos, as imagens foram capturadas numa câmera¹ acoplada a um microscópio óptico² e um computador³, utilizando o software Q capture^{®4} com aumento de 400 vezes. Para cada articulação têmporomandibular foram capturadas e analisadas três imagens (região anterior, central e posterior do côndilo). Para cada imagem foram determinados três pontos equidistantes, onde foram mensuradas as espessuras das camadas da cartilagem condilar (camadas fibrosa, proliferativa, de maturação e hipertrófica), totalizando 9 mensurações de cada camada por lâmina. Foi utilizada a ferramenta de medição de retas do sistema de software Image J^{®5} calculado em mm. Os valores obtidos foram lançados numa planilha eletrônica Excel^{®6} e o cálculo da média de espessura de cada camada foi estabelecido.

¹ Olympus[®] América Inc., Center Valley, PA, USA, Qcolor 5, Coolet, RTV.

² Modelo Lambda LQT 2, ATTO Instruments Co., Hong Kong, China.

³ Modelo Dimension 5150, Dell[®] Inc., Eldorado do Sul, RS, Brasil.

⁴ Versão 5.1; Quantitative Imaging Corporation, Inc.; 2005.

⁵ Versão 1.48 National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.

⁶ Windows Excel[®] 2010.

A quantificação de condrócitos foi realizada a partir da camada hipertrófica, considerando na contagem os condrócitos com núcleo visível.

A quantificação de fibras colágenas do tipo I, seguiu a metodologia de Artuzzi 2012. Utilizou-se o equivalente a uma lâmina para cada espécime. As imagens foram capturadas por um avaliador cego, através de uma câmera de vídeo Olympus®⁷, acoplada a um microscópio binocular⁸ e a um computador⁹ utilizando-se o *software software Image-Pro Plus®*¹⁰, em aumento de 200x.

A quantificação do colágeno tipo I foi realizada numa área de 1mm² na região anterior (1), central (2) e posterior (3) do côndilo e na totalidade das estruturas articulares (côndilo, disco e a estrutura temporal articular A birrefringência vermelho-alaranjada identificou a presença de colágeno tipo I).

Análise estatística

Os dados foram analisados no programa IBM SPSS Statistics, versão 22. A análise descritiva dos dados foi realizada através de média e desvio-padrão ou mediana e intervalo interquartil. Foi testada a normalidade dos dados através do Teste Kolmogorov Smirnov. Para os dados que se ajustaram à distribuição normal, a interação entre grupo e lado foi realizada através da Análise de Variância Múltipla complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey; e as variáveis que não se ajustaram à distribuição normal, foram avaliadas através do Teste Não-paramétrico Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

⁷ Olympus® América Inc., Center Valley, PA, USA, Qcolor 5, Coolset, RTV.

⁸ CX41RF, Olympus Lantin América Inc., Miami, FL, USA.

⁹ Modelo Dimension 5150, Dell® Inc., Eldorado do Sul, RS, Brasil.

¹⁰ Versão 5.1, Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo Japão.

Resultados

Na avaliação da espessura das camadas da cartilagem condilar (Tabelas 2 e 3), não houve diferença significativa entre as médias das camadas fibrosa e proliferativa entre os grupos (controle e teste) e lados (direito e esquerdo) ($p>0,05$).

Na avaliação da espessura da camada de maturação observou-se interação significativa entre grupo e lado. A média da espessura da camada no grupo teste foi significativamente maior do que no grupo controle no côndilo esquerdo ($p=0,016$).

Na camada hipertrófica não houve interação significativa entre grupo e lado, mas quanto aos efeitos principais, apenas um grupo foi significativo ($p=0,004$); ou seja, independentemente do lado, o grupo teste apresentou média de espessura significativamente maior do que o grupo controle (Figura 1).

Tabela 2. Distribuição das médias e desvios-padrão da espessura das camadas de cartilagem da articulação temporomandibular em mm, nos grupos controle e teste bilateralmente.

Camada	Grupo	Lado				Total	
		D		E		Média	DP
		Média	DP	Média	DP		
Fibrosa	Controle	0,244	0,104	0,244	0,065	0,244	0,083
	Teste	0,200	0,029	0,235	0,090	0,219	0,069
	Total	0,224	0,079	0,240	0,076	0,232	0,076
Proliferativa	Controle	0,389	0,077	0,339	0,067	0,364	0,074
	Teste	0,318	0,062	0,307	0,057	0,312	0,057
	Total	0,356	0,077	0,323	0,062	0,339	0,070
Maturação	Controle	0,475 ^{AB}	0,138	0,346 ^B	0,092	0,410	0,131
	Teste	0,394 ^{AB}	0,147	0,503 ^A	0,096	0,453	0,129
	Total	0,437	0,142	0,424	0,121	0,431	0,130
Hipertrófica	Controle	0,529	0,120	0,426	0,130	0,478 ^B	0,131
	Teste	0,647	0,182	0,643	0,100	0,645 ^A	0,137
	Total	0,584	0,157	0,534	0,158	0,558	0,157

Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente através da Análise de Variância, complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Tabela 3. Tabela da Análise de Variância ao nível de significância de 5% da média da espessura das camadas de cartilagem da articulação temporomandibular, nos grupos controle e teste bilateralmente.

Camada	Causa de Variação	Soma de quadrados	Grau de liberdade	F	p
Fibrosa	Grupo	0,005	1	0,75	0,395
	Lado	0,002	1	0,32	0,577
	Grupo * Lado	0,002	1	0,34	0,566
	Erro experimental	0,144	23		
	Total	0,152	26		
Proliferativa	Grupo	0,018	1	4,10	0,055
	Lado	0,006	1	1,42	0,245
	Grupo * Lado	0,003	1	0,58	0,456
	Erro experimental	0,101	23		
	Total	0,128	26		
Maturação	Grupo	0,010	1	0,68	0,417
	Lado	0,001	1	0,05	0,830
	Grupo * Lado	0,095	1	6,70	0,016
	Erro experimental	0,327	23		
	Total	0,436	26		
Hipertrófica	Grupo	0,188	1	10,46	0,004
	Lado	0,019	1	1,08	0,310
	Grupo * Lado	0,017	1	0,92	0,347
	Erro experimental	0,413	23		
	Total	0,639	26		

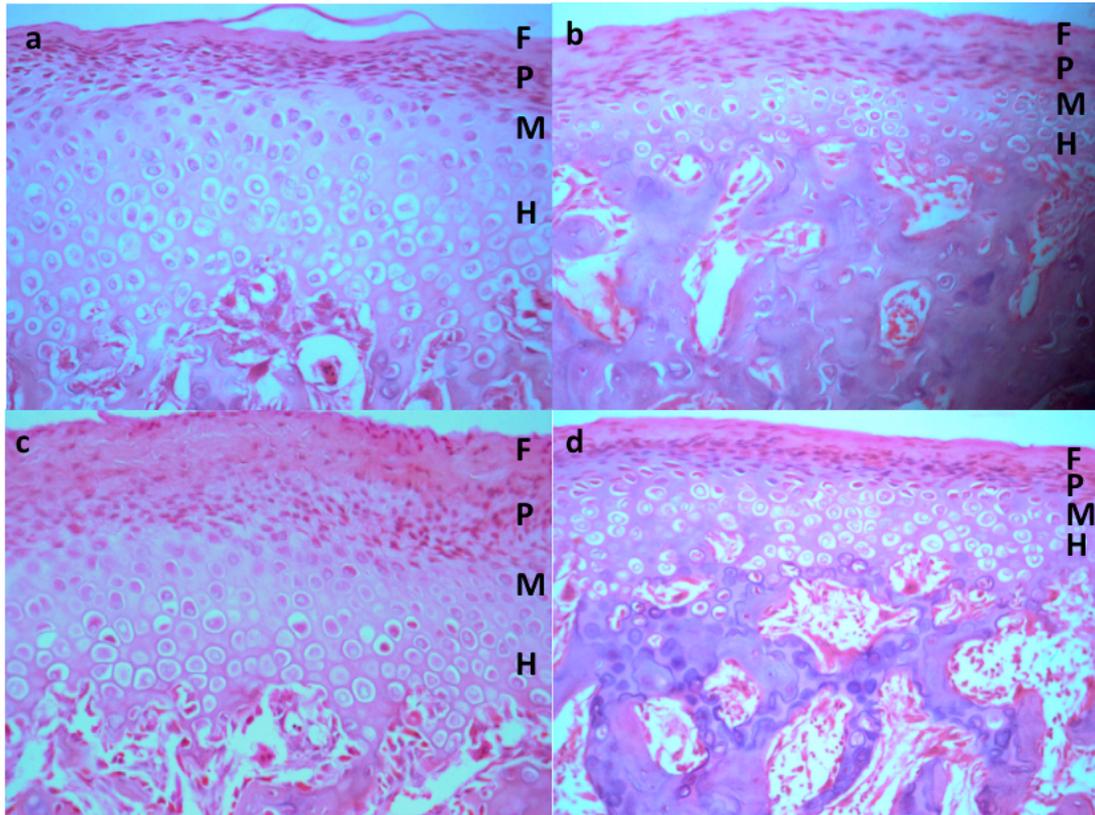


Figura 1. a) Imagem histológica da região média do côndilo mandibular do grupo teste lado direito. b) Imagem histológica da região média do côndilo mandibular do grupo controle lado direito. c) Imagem histológica da região média do côndilo mandibular do grupo teste lado esquerdo. d) Imagem histológica da região média do côndilo mandibular do grupo controle lado esquerdo. Observa-se a diferença de espessura da camada hipertrófica entre os grupos. HE, 400X.

Nota: As letras à direita, correspondem às camadas de cartilagem: fibrosa (F), proliferativa (P), maturação (M) e hipertrófica (H).

Na avaliação do número de condrócitos não foram encontradas diferenças entre as médias dos grupos (controle e teste) ($p > 0,05$) (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4. Distribuição das médias e desvios-padrão da contagem do número de condrócitos com núcleo definido em toda camada hipertrófica da articulação temporomandibular, nos grupos controle e teste bilateramente.

Grupo	Lado				Total	
	D		E		Média	DP
	Média	DP	Média	DP		
Controle	66,86	35,49	58,62	23,78	62,74	29,34
Teste	51,00	17,90	53,00	19,32	52,08	17,92
Total	59,54	28,83	55,81	21,02	57,60	24,66

Tabela 5. Análise de Variância ao nível de significância de 5% da contagem do número de condrócitos.

Causa de Variação	Soma de quadrados	Grau de liberdade	F	p
Grupo	774,861	1	1,20	0,284
Lado	65,375	1	0,10	0,753
Grupo * Lado	176,095	1	0,27	0,606
Erro experimental	14794,286	23		
Total	15810,897	26		

A quantidade de colágeno tipo I na região posterior do côndilo no grupo controle foi significativamente maior no lado esquerdo do que no lado direito ($p=0,007$).

A quantidade de colágeno tipo I em geral, ou seja, no côndilo, disco e a estrutura temporal articular, apresentou diferença entre o grupo teste e controle no lado direito. O lado direito no grupo teste apresentou menor quantidade de colágeno em comparação ao grupo controle ($p=0,035$). No grupo teste, o lado direito apresentou valores menores em comparação do esquerdo ($p=0,014$) (Tabela 6) (Figura 2).

Tabela 6. Distribuição das medianas e intervalo interquartil (Percentil 25; Percentil 75) da quantificação do colágeno tipo I na região anterior, central e posterior côndilo mandibular, nos grupos controle e teste bilateramente.

	Grupo	Lado		P
		D	E	
		Mediana (P25 ; P75)	Mediana (P25 ; P75)	
Anterior	Controle	4,0 (0 ; 5,7)	2,3 (0 ; 3,0)	0,456
	Teste	0 (0 ; 0,4)	0 (0 ; 0,7)	0,731
	p	0,073	0,318	
Centro	Controle	1,7 (0 ; 4,0)	5,3 (0,7 ; 9,7)	0,156
	Teste	0,2 (0 ; 1,0)	0 (0 ; 10,0)	0,836
	p	0,181	0,318	
Posterior	Controle	1,0 (0 ; 1,7)	7,0 (5,3 ; 19,3)	0,007
	Teste	0 (0 ; 0,8)	2,7 (0 ; 14,0)	0,073
	p	0,138	0,128	
Geral	Controle	169,7 (49,3 ; 326)	263,7 (186,7 ; 380)	0,318
	Teste	33,2 (18 ; 81,7)	167,0 (145,3 ; 533,7)	0,014
	p	0,035	0,620	

p= Nível mínimo de significância do Teste Não-paramétrico Mann-Whitney

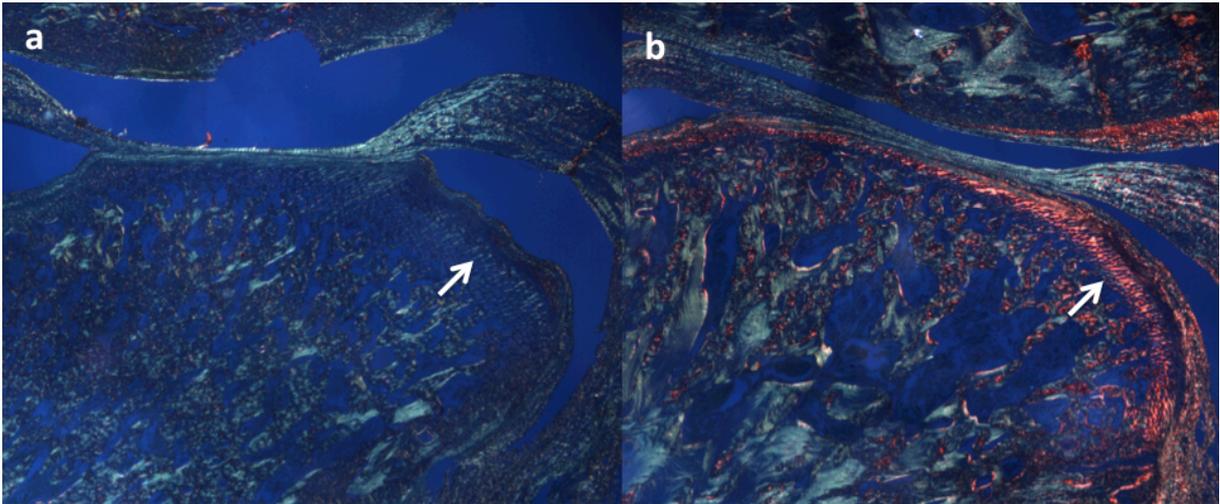


Figura 2. a) Imagem histológica da região do côndilo mandibular, disco e estrutura temporal articular lado direito. Grupo teste. b) Imagem histológica da região do côndilo mandibular, disco e estrutura temporal articular lado direito. Grupo controle. Observa-se a diferença da birrefringência vermelho-alaranjada entre os grupos teste e controle (→). Picrossírius, 200x.

DISCUSSÃO

A amostra utilizada neste estudo, foi uma amostra de conveniência e aproveitou material biológico da pesquisa de Pacheco *et al.* (2015). O aproveitamento de material biológico representa um importante recurso utilizado em pesquisa, não somente na redução de custos, mas sobretudo na demonstração de respeito pela vida, resultando numa melhor utilização de informações e extração de dados gerados a partir da vida de um único ser, seguindo os princípios éticos da experimentação animal (Andrade *et al.* 2002). O rato foi utilizado como modelo experimental por ser um animal de pequeno porte, baixo custo e fácil manuseio (Petrovic & Stuzman 1991; Yamaza 2003; Porto *et al.* 2010). A articulação temporomandibular do rato é muito semelhante morfológicamente e funcionalmente à humana, o que corrobora a escolha do modelo animal nesta pesquisa. Sob o ponto de vista morfológico, a diferença está na ausência de eminência articular, fato esse que permite uma amplitude maior nos movimentos protrusivos da mandíbula (Petrovic & Stuzman 1991; Porto *et al.* 2010). Animais com 60 dias foram utilizados no estudo, caracterizando, nesta idade,

maturidade sexual e musculoesquelética equivalentes a um animal adulto (Andrade *et al.* 2002).

A dose de ácido zoledrônico utilizada foi de 0,2 mg/kg, por via intraperitoneal, aplicado semanalmente, durante o período de 3 semanas, totalizando uma dose de 0,6 mg/kg do fármaco. Para o cálculo da dose do fármaco e seus intervalos utilizados neste estudo, Pacheco (2013) E Pacheco *et al.* (2015) levaram em consideração as diferenças entre o metabolismo ósseo das duas espécies. A dose elevada utilizada (duas vezes a dose humana mais alta, em m² de área de superfície corporal), quando comparada ao emprego em humanos, justifica-se diante do metabolismo acelerado e da alta taxa de excreção dos bisfosfonatos, características do modelo animal empregado. Em ratos, uma única injeção intravenosa de 1,6 mg/Kg, foi bem tolerada e não associada à mortalidade. A dose total do fármaco utilizada em outros estudos que avaliaram a região da articulação temporomandibular apresentaram uma variação de entre 0,1 mg/Kg, e 2,4 mg/Kg (Tatli *et al.* 2014; Camacho *et al.* 2013; Renders *et al.* 2014). De acordo com Bi *et al.* (2010) não há diferenças entre a aplicação intravenosa e intraperitoneal da administração de ácido zoledrônico na avaliação do efeito do medicamento sobre a estrutura óssea.

A grande maioria dos trabalhos experimentais que avaliou o ácido zoledrônico empregou a associação de drogas com características imunossupressoras ou induziram o desenvolvimento prévio de doenças metabólicas (Sonis *et al.* 2008; Bi *et al.* 2010). Considerando o fármaco, o presente trabalho analisou, exclusivamente, o efeito da medicação sobre a articulação temporomandibular em animais saudáveis, já que o emprego de outras medicações poderia interferir na análise, concordando com outros autores (Camacho *et al.* 2013; Tatli *et al.* 2014; Renders *et al.* 2014).

A articulação temporomandibular, por se tratar de uma articulação bilateral e interdependente, foi avaliada bilateralmente. Além disso, foi considerado o fato de ter sido

realizado no estudo de Pacheco *et al.* (2015) a extração do primeiro molar superior esquerdo e defeito na cora do primeiro molar mandibular ipsilateral, simulando uma cavidade de cárie com destruição coronária. Esses procedimentos geraram alterações oclusais. Jiao et al 2008 observou que alterações oclusais resultam em degeneração da cartilagem articular, caracterizada por redução de proliferação e aumento da morte dos condrócitos, predominantemente em ratos fêmeas quando comparado aos ratos machos. Na comparação com nosso estudo, onde ratos machos foram empregados não foram observadas diferenças na espessura total da cartilagem condilar entre os grupos (teste e controle), nem com relação aos lados. Aos ratos machos parece estar atribuída uma maior capacidade de manutenção e recuperação da cartilagem articular. A presença de estrogênio poderia explicar essa diferença.

Por outro lado, na análise da espessura total da cartilagem condilar não foram observadas diferenças entre os grupos (teste e controle), nem com relação aos lados. Na análise da espessura das camadas da cartilagem condilar verificou-se o aumento significativo da camada de maturação (lado esquerdo) e da camada hipertrófica (lados direito e esquerdo) no grupo teste quando comparadas ao controle. Esses achados corroboram o possível efeito do ácido zoledrônico sobre os condroblastos, células responsáveis pela síntese de matriz extracelular (Renders et al., 2014).

Não foram observadas diferenças significativas na quantificação do número de condrócitos nos grupos teste e controle, nem na comparação entre os lados, sugerindo a manutenção fisiologia articular. Uma redução no número de condrócitos poderia predispor a degradação da cartilagem. Já uma proliferação de condrócitos poderia representar uma resposta histológica do tecido doente na tentativa de neutralizar uma degeneração da cartilagem e assim restaurar o tecido lesado (Jiao et al., 2009).

A quantidade de colágeno tipo I, considerando a avaliação das estruturas articulares (côndilo mandibular, disco articular, estrutura temporal) foi menor no grupo teste (lado

direito) quando comparada ao grupo controle. No grupo teste o lado direito apresentou menor quantidade em comparação ao lado esquerdo. Na avaliação das áreas condilares, o grupo controle (lado esquerdo), apresentou maior quantidade de colágeno na região posterior do côndilo. Esses achados sugerem que o ácido zoledrônico age sobre os fibroblastos, células responsáveis pela secreção do colágeno. O colágeno I é a principal proteína da fibrocartilagem, sendo encontrado também em torno das células hipertróficas, próximo à zona de ossificação endocondral. A diminuição da quantidade de colágeno sugere alteração no padrão fisiológico da articulação temporomandibular (Salo *et al.* 1996). De acordo com Jiao *et al.* (2010), a região posterior do côndilo é extremamente sensível aos estímulos anormais, sendo a mais afetada quando comparada às outras regiões.

A metodologia empregada nessa pesquisa permite concluir que o ácido zoledrônico exerce efeito sobre as articulações temporomandibulares de ratos, resultando em aumento das camadas de maturação e hipertrófica, não alterando o número de condrócitos e diminuindo a quantidade de colágeno do tipo I. Os resultados aqui apresentados são animadores e contribuem para a continuidade das pesquisas. Estudos ainda são necessários para compreender os efeitos desse fármaco sobre outras estruturas articulares.

REFERENCIAS

- Andrade A *et al.* (2002). Animais de Laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz.
- Artuzi EA. (2012). Influência da Condilotomia sobre a articulação temporomandibular de coelhos com osteoartrite quimicamente induzida [dissertação]. Porto alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Bagam J *et al.* (2009). Osteonecrosis of the jaws in patient treated with intravenous bisphosphonates (BRONJ): A concise update. *Oral Oncology*. 45, 551-554.

- Bi Y *et al.* (2010). Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *Am. J Pathol.* 177, 280-290.
- Camacho AF *et al.* (2013). Short-term effect of zoledronic acid upon fracture resistance of the mandibular condyle and femoral head in an animal model. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 18, e421-6.
- Fleisch H. (1995). Bisphosphonates in bone disease: from the laboratory to the patient. 2nd ed. London: Parthenon Publishing Group. v. 1.
- Gabbert TI *et al.* (2015). Risk factors influencing the duration of treatment with bisphosphonates until occurrence of an osteonecrosis of the jaw in 963 cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 141, 749-758.
- Jiao K *et al.* (2006). Death and proliferation of chondrocytes in the degraded mandibular condylar cartilage of rats induced by experimentally created disordered occlusion. *Apoptosis.* 14, 22-30.
- Mehrotra B & Ruggiero S. (2006). Bisphosphonate Complications including osteonecrosis of the jaw. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 356-360, 515.
- Pacheco VN. (2013). Terapia por bisfosfonato nitrogenado: avaliação em ratos da estrutura alveolar [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Pacheco VN *et al.* (2015). Nitrogen-containing bisphosphonate therapy: assessment of the alveolar bone structure in mice: a blind randomized controlled trial. *Int J Exp Pathol.* 96, 255-60.
- Petrovic AG & Suttzmann JJ. (1991). Effects on the Rat Mandible of a Chincup-Type and of Partial or Complete Immobilization. *Proc Finn Dent Soc.* 87, 85-91.
- Porto GG *et al.* (2010). Comparison between human and rat TMJ: anatomic and histopathologic features. *Acta Cir. Bras.* 25, 290-293 .
- Ramirez-Yañez GO. (2004). Cartilagem condilar da mandíbula: uma revisão. *Ortop Rev Int*

Ortop Func. 1, 85-94.

Renders GA *et al.* (2014). Implications of high-dosage bisphosphonate treatment on bone tissue in the jaw and knee joint. *Calcif Tissue Int.* 95, 436-445.

Russel RGG *et al.* (2008). Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int.* 19, 733-759.

Salo LA *et al.* (1996). The expression of types X and VI collagen and fibrillin in rat mandibular condylar cartilage. Response to mastication forces. *Acta Odontol Scand.* 54, 295-302.

Sonis ST *et al.* (2008). Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. *Oral Oncol.* 45, 164-172.

Tatli U *et al.* (2014). Effects of zoledronic acid on physiologic bone remodeling of condylar part of TMJ: a radiologic and histomorphometric examination in rabbits. *Scientific WorldJournal.* 2014, 649026.

Ten Cate AR. (2008). *Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função.* 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

Yamaza T *et al.* (2003). NF-kB Activation and iNOS Expression in Synovitis of the Rt Temporomandibular Joints after Induced Synovitis. *J Den Res.* 82, 183-188.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento da expectativa de vida da população reflete nas possibilidades de acometimento de doenças crônicas. Durante a entrevista dirigida ao paciente, o cirurgião-dentista deve estar atento à história pregressa e atual da condição sistêmica do paciente, bem como à possibilidade do uso de bisfosfonatos, em especial do ácido zoledrônico. Essa informação é de suma importância para o estabelecimento do plano de tratamento específico para o paciente.

Muitas vezes nos deparamos com patologias que desafiam o conhecimento prévio e dificultam o estabelecimento de um diagnóstico presuntivo, principalmente por não encontrarmos relação de causa e efeito. Baseado nisto, este trabalho se propôs a estudar, de forma inicial, os efeitos do ácido zoledrônico na articulação temporomandibular, considerando o aumento do número de pessoas utilizando esse fármaco e o número restrito de publicações sobre os efeitos deste na referida articulação.

Nossos resultados se constituem em passo importante para a continuidade das pesquisas. Sugerimos prosseguir com este estudo, aumentando o tempo, em dias, de exposição dos animais ao uso do ácido zoledrônico e acrescentando uma análise sobre outras estruturas articulares.

REFERENCIAS

1. Öberg T, Carlsson GE, Fajers CE. The Temporomandibular Joint. A morphologic study on a human autopsy material. *Acta Odont. Scand* 1971; 29(3): 349-384.
2. Paiva HJ. Noções e conceitos básicos em oclusão, disfunção temporomandibular e dor orofacial. São Paulo: Santos; 2008.
3. Ten Cate AR. Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
4. Villa N, Rode SM. Histologia da ATM. In: Barros JJ, Rode SM. Tratamento das disfunções craniomandibulares - ATM. São Paulo: Santos; 1995.
5. Ramirez-Yañez GO. Cartilagem condilar da mandíbula: uma revisão. *Ortop Rev Int Ortop Func.* 2004;1(1):85-94.
6. Luder HU. Age changes in the articular tissue of human mandibular condyles from adolescence to old age: a semiquantitative light microscopic study. *Anat Rec.* 1998;251(4):439-47.
7. Marchini L, Santos JFF. Oclusão dentária: princípios e prática clínica. São Paulo: Elsevier; 2011.
8. Puricelli E, Ponzoni D, Munaretto JC, Corsetti A, Leite MG. Histomorphometric analysis of the temporal bone after change of direction of force vector of mandible: an experimental study in rabbits. *J Appl Oral Sci.* 2012; 20(5):526-30.
9. Okeson JP. Tratamento das desordens temporomandibulares e oclusão. 6. ed. São Paulo: Elsevier; 2008.
10. Huang Q, Opstelten D, Samman N, Tideman H. Experimentally induced unilateral tooth loss: histochemical studies of the temporomandibular joint. *J Dent Res.* 2002;81(3):209-13.
11. Widler L, Jaeggi KA, Glatt M, Muller K, Bachmann R, Bisping M, et al. Highly potent geminal bisphosphonates: from pamidronate disodium (Aredia) to zoledronic acid (Zometa). *J Med Chem.* 2002;45(17):3721-38.
12. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B, et. al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: 2009 update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(5 Suppl):2-12.
13. Russel RGG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int.* 2008; 19(1):733-759.
14. 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.

15. Bagam J, Scully C, Sabater V, Jimenez Y. Osteonecrosis of the jaws in patient treated with intravenous bisphosphonates (BRONJ): A concise update. *Oral Oncology*. 2009;45(7):551-4.
16. Ruggiero SL, Gralow J, Marx RE, Hoff AO, Schubert MM, Huryn JM, et al. Practical guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with cancer. *J Clin Oncol Pract*. 2006; 2(1):7-14.
17. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003;61(9):1115-7.
18. Migliorati CA. Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis. *J Clin Oncol*. 2003;21(22):4253-4.
19. Wang J, Goodger NM, Pogrel MA. Osteonecrosis of the jaws associated with cancer chemotherapy. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003;61(9):1104-7.
20. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw: 2014 Update [internet]. AAOMS; 2014. [acesso em 2015 Nov 4]. Disponível em: http://www.aaoms.org/docs/position_papers/mronj_position_paper.pdf?pdf=MRONJ-Position-Paper.
21. Migliorati CA, Woo SB, Hewson I, Barasch A, Elting LS, Spijkervet FK, et al. A systematic review of bisphosphonate osteonecrosis (BON) in cancer. *Support Care Cancer*. 2010;18(8):1099-106.
22. Vidal-Real C, Pérez-Sayáns M, Suárez-Peñaranda J-M, Gándara-Rey J-M, García-García A. Osteonecrosis of the jaws in 194 patients who have undergone intravenous bisphosphonate therapy in Spain. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015;20(3):e267-e272.
23. Wang EP, Kaban LB, Strewler GJ, Raje N, Troulis MJ. Incidence of osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma and breast or prostate cancer on intravenous bisphosphonate therapy. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; 65:1328-31.
24. Fliefel R, Tröltzsch M, Kühnisch J, Ehrenfeld M, Otto S. Treatment strategies and outcomes of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) with characterization of patients: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015;44(5):568-85.
25. Kobayashi Y, Hiraga T, Ueda A, Wang L, Matsumoto-Nakano M, Hata K, et al. Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice. *J Bone Miner Metab*. 2010;28(2):165-75.
26. Allen MR, Burr DB. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: So many hypotheses, so few data. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67(5 Suppl):61-70.
27. Landesberg R, Woo V, Cremers S, Cozin M, Marolt D, Vunjak-Novakovic G, et al. Potential pathophysiological mechanisms in osteonecrosis of the jaw. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1218:62-79.

28. Enomoto A, Uchihashi T, Izumoto T, Nakahara H, Hamada S. Suppurative arthritis of the temporomandibular joint associated with bisphosphonate: a case report. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012;70(6):1376-9.

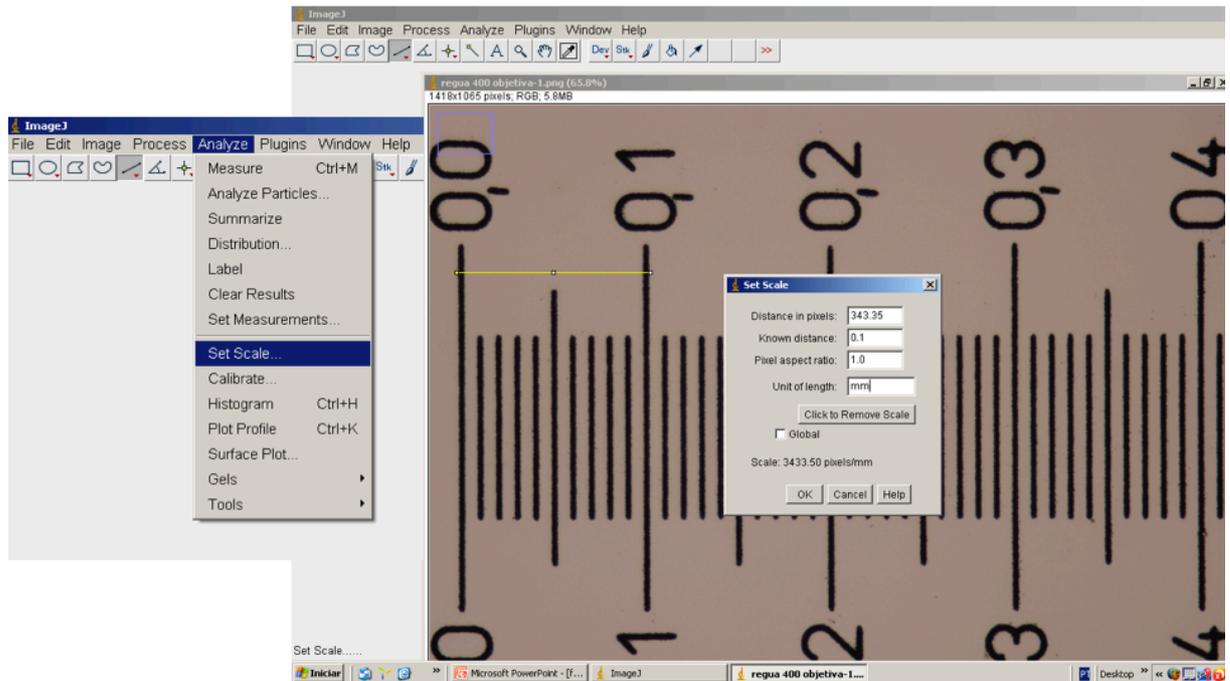
APÊNDICE A – COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO INTRACLASSE

		Inter examinador	Intra examinador		
			M	C	J
HE	CAMADA FIBROSA	0,826	0,804	0,903	0,971
	CAMADA PROLIFERATIVA	0,827	0,956	0,969	0,954
	CAMADA MATURAÇÃO	0,832	0,854	0,990	0,958
	CAMADA HIPERTRÓFICA	0,847	0,931	0,821	0,948
PICRO	ANTERIOR	0,904	0,978	0,874	0,998
	CENTRO	0,805	0,953	0,957	0,995
	POSTERIOR	0,930	0,962	0,975	0,843
	GERAL	0,994	0,992	0,990	0,989
CONDRÓCITOS		0,996	0,970	0,896	0,969

Através do Coeficiente de Correlação Intraclassa, verifica-se uma excelente concordância intra e inter examinador (quanto mais próximo de 1, maior a concordância)

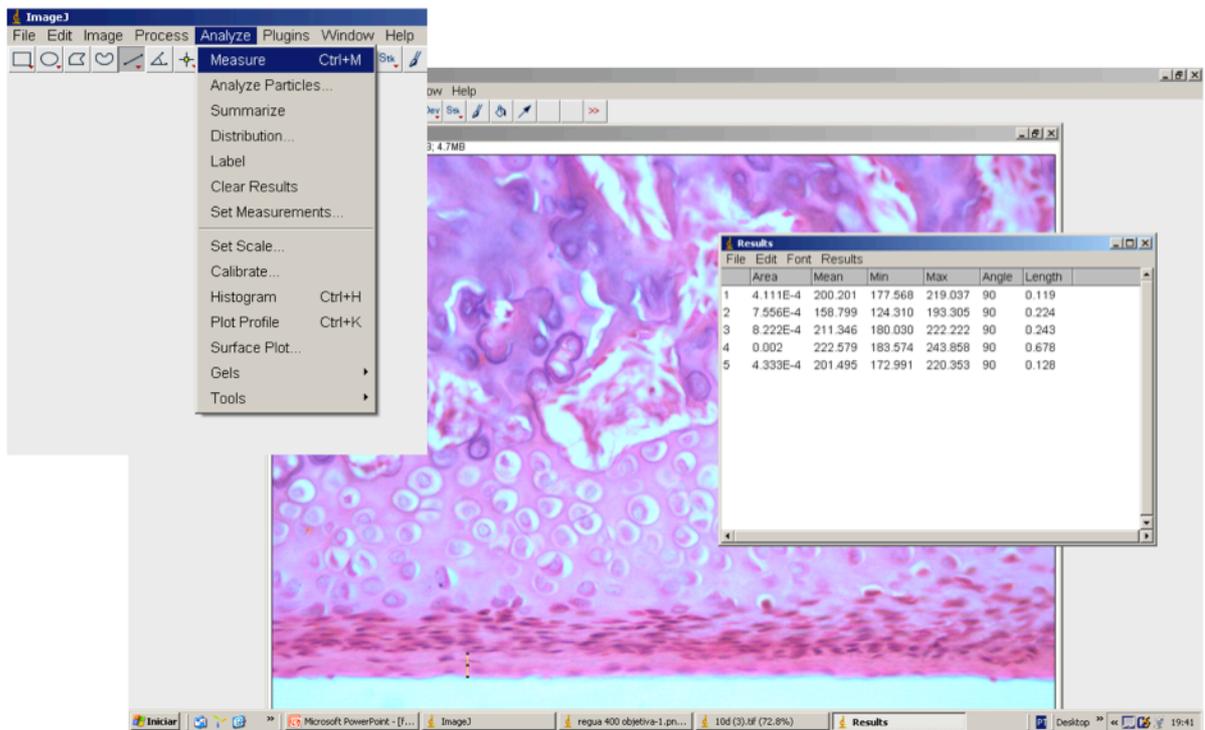
APÊNDICE B – ANÁLISE DOS DADOS

Para a medição da espessura da cartilagem condilar, num aumento de 400 vezes, foi utilizada a ferramenta de medição de retas do sistema de software Image J[®]

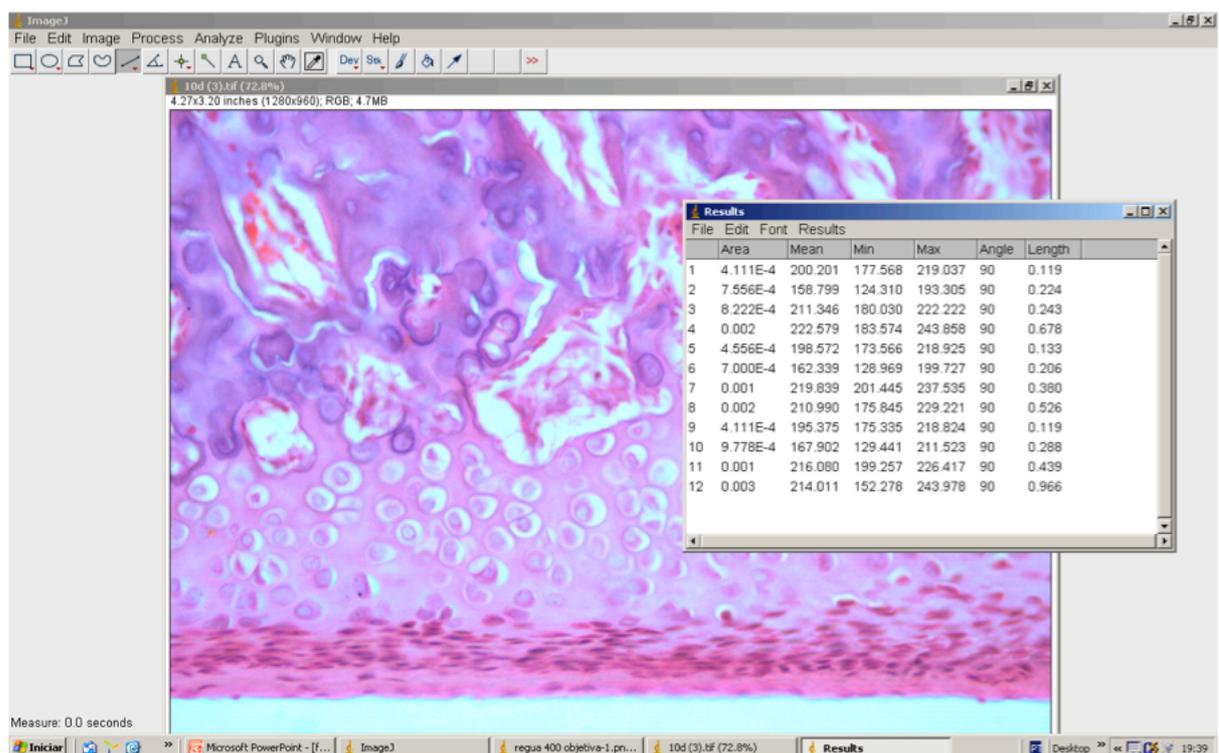


Foi realizada a transferência da escala e conversão dos pixels para mm. As imagens foram capturadas numa resolução de 2560x1920 pixels, aumento de 400 vezes. 3433.50

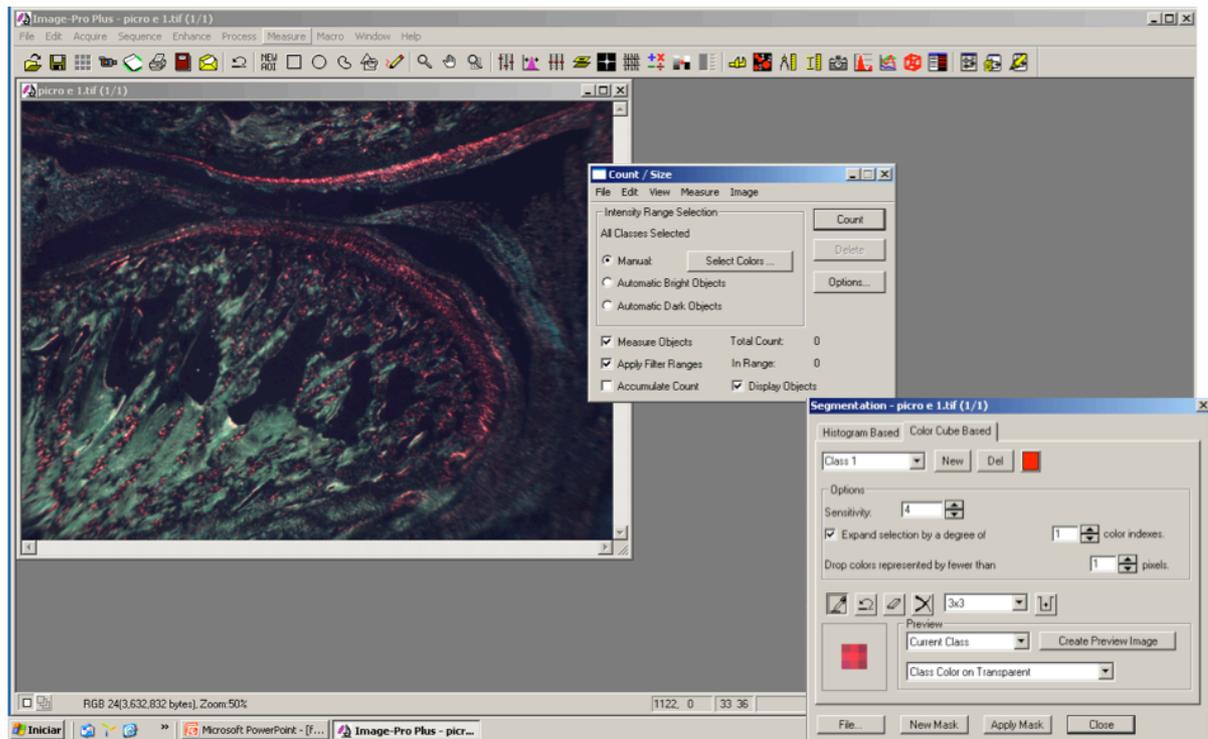
pixels corresponderam à 1mm.



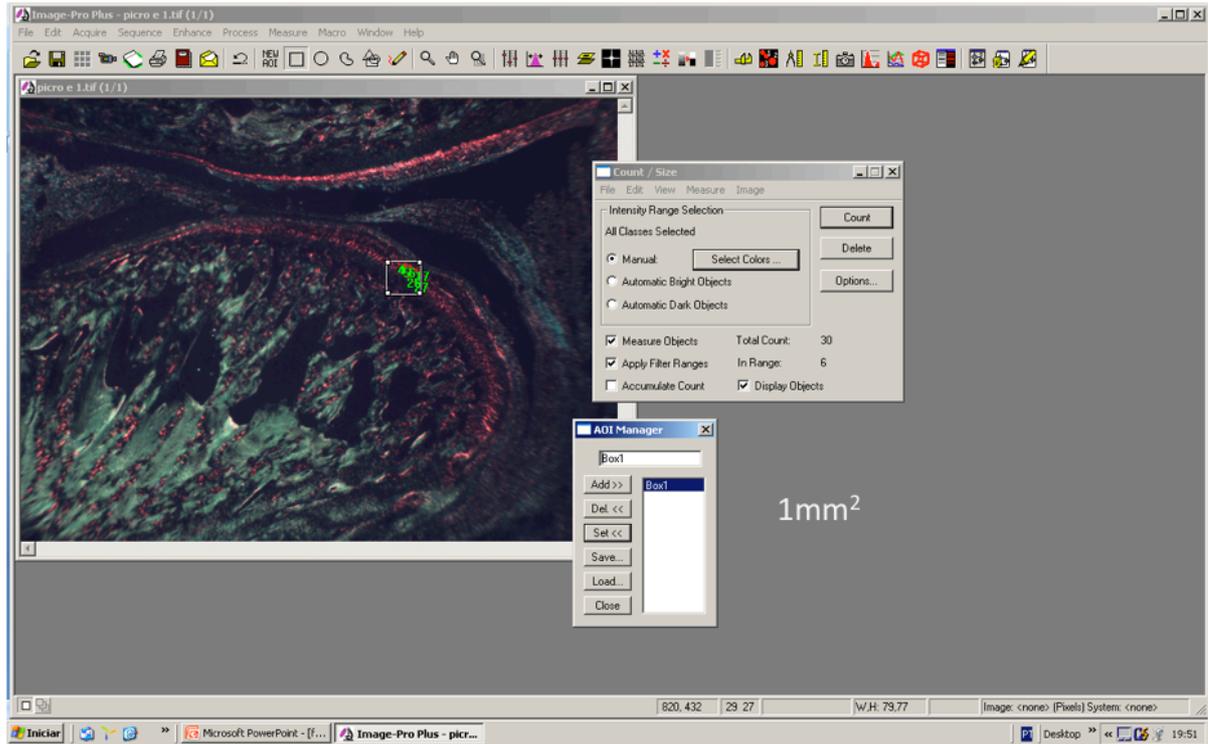
Para cada imagem foram determinados três pontos equidistantes, onde foram mensuradas as espessuras das camadas da cartilagem condilar (camadas fibrosa, proliferativa, de maturação e hipertrófica) pel ferramenta de medição de retas, totalizando 9 mensurações de cada camada por lâmina.



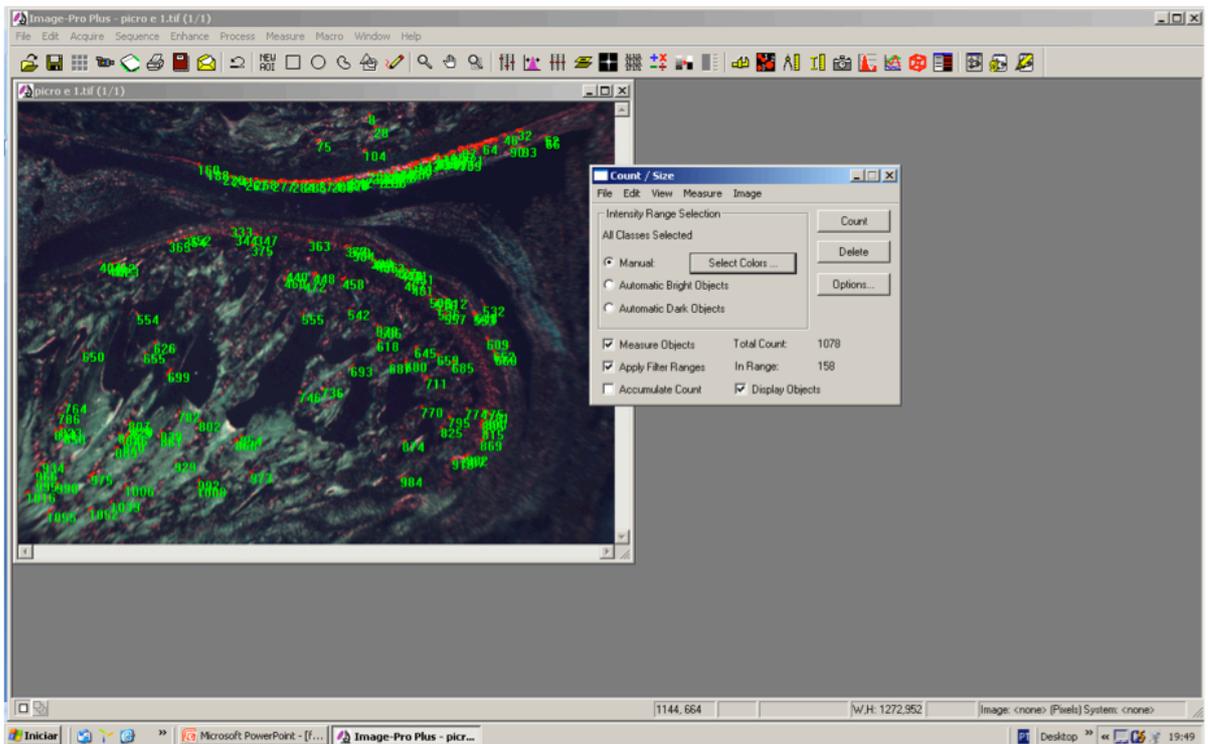
A quantificação do colágeno tipo I foi realizada pelo o *software software Image-Pro Plus®*, em aumento de 200x. A birrefringência vermelho-alaranjada identificou a presença de colágeno tipo I.



Numa área de 1mm^2 a quantidade de colágeno tipo I foi analisada na região anterior (1), central (2) e posterior (3) do cõndilo.



A quantidade de colágeno tipo I foi analisada também na totalidade das estruturas articulares (côndilo, disco e a estrutura temporal articular).



ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



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

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP/HCPA), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisou o projeto:

Projeto: 130380

Data da Versão do Projeto: 04/09/2013

Pesquisadores:

EDELA PURICELLI

DEISE PONZONI

JESSICA CERIOLI MUNARETTO

Título: ANÁLISE HISTOLÓGICA E TOMOGRÁFICA DO EFEITO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NA ARTICULAÇÃO TÊMPOROMANDIBULAR -ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais de pesquisa, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

- Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa não participaram do processo de avaliação dos projetos nos quais constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do projeto deverá ser comunicada ao CEP/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.

Porto Alegre, 10 de outubro de 2013.

Dr. Alessandro Osvaldt
Coordenador CEUA/HCPA