

Revista Brasileira Multidisciplinar

ISSN 1415-3580
e-ISSN 2527-2675

<http://revistarebram.com/index.php/revistauniara>

AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOBLÁSTICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE RATOS TRATADOS CRONICAMENTE COM BIFOSFONATOS

Tauyra Mateus^{*}; Ana Lúcia de Oliveira Bonfá^{**}; Janaína Cristina de Freitas Alvarenga^{***}; Rômulo Augusto da Costa Chaves^{****}; Vivianne Ruocco Vetucci^{*****}; Ana Cláudia Fernandes Ballan^{*****}; Luís Henrique Montezori^{*****}; Ana Paula de Souza Faloni^{*****}

^{*}Discente No Programa De Pós Graduação Ciências Odontológicas - Universidade de Araraquara - Uniara.

^{**}Mestre Em Biotecnologia Em Medicina Regenerativa E Química Medicinal - Universidade de Araraquara - Uniara.

^{***}Mestranda em Ciências Odontológicas - Universidade de Araraquara - Uniara.

^{****}Mestre em Ciências Odontológicas - Universidade de Araraquara - Uniara.

^{*****}Graduada em Odontologia - Universidade de Araraquara - Uniara.

^{*****}Docente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal - Universidade de Araraquara - Uniara.

*Autor para correspondência e-mail: tauyra_@hotmail.com

PALAVRAS-CHAVE

Alendronato de Sódio
Ácido Zoledrônico
Osteoblastos
Viabilidade Celular
Mineralização

KEYWORDS

Sodium Alendronate
Zoledronic Acid
osteoblasts
Cell Viability
Mineralization

RESUMO

Apesar dos bifosfonatos (BPs), fármacos antirreabsortivos, atuarem principalmente nos osteoclastos, a ação desses medicamentos em osteoblastos tem sido demonstrada em experimentos in vitro. Porém, na maioria desses experimentos, há exposição das culturas de osteoblastos aos BPs. Na presente investigação, foram avaliados osteoblastos diferenciados a partir de células-tronco mesenquimais (CTMs) de ratos tratados in vivo com alendronato de sódio (ALE: 1mg/ml/kg/semana), ácido zoledrônico (ZOL: 0,3mg/ml/kg/semana) ou solução salina (VEH: 0,009mg/ml/kg/semana) durante 13 semanas. As CTMs da medula óssea dos fêmures direitos dos animais foram cultivadas em meio osteogênico, na densidade de 5.000 células/200µl/poço. Após 21 dias de cultura, osteoblastos foram avaliados quanto à viabilidade celular e à formação de matriz mineralizada. Foram observadas viabilidades celulares semelhantes nos grupos BPs (ALE e ZOL) e superiores ao controle (VEH). Quanto à formação da matriz mineralizada, houve maior mineralização no grupo ZOL em relação ao grupo ALE, sendo ambas inferiores ao observado no grupo VEH. Os resultados obtidos sugerem que a exposição in vivo das CTMs ao ALE e ao ZOL influenciou a atividade dos osteoblastos in vitro. Ambos os medicamentos utilizados são BPs nitrogenados; contudo, na dose empregada, o ALE afetou mais significativamente a formação de matriz mineralizada.

ABSTRACT

Evaluation of the osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells from rats chronically treated with bisphosphonates

Although bisphosphonates (BPs), antireabsorptive drugs, mostly behave in osteoclasts, the real effect of these drugs in osteoblasts have been demonstrated by in vitro experiments. However, in most of the studies, the osteoblasts are exposed to the BPs in the cultures. In the present essay were differentiated osteoblasts from mesenchymal stem cells (MSCs) of rats previously treated, during 13 weeks, with sodium alendronate (ALE: 1mg/ml/kg/week), zoledronic acid (ZOL: 0,3mg/ml/kg/week) or saline solution (VEH: 0,009mg/ml/kg/week) were evaluated. The MSCs from right femurs were cultivated in osteogenic culture medium, with density of 5000 cells/200µl/well. After 21 days of culture, osteoblasts were evaluated about the cellular viability and about the mineralized matrix formation. It was found similar cell viability in BPs groups (ALE and ZOL), which were higher than the one observed for VEH. Regarding the mineralized matrix formation, ZOL showed higher values in comparison to ALE, however, both exhibited lower matrix formation than VEH group. The results suggest that in vivo exposure of MSCs to ALE and ZOL can change the normal activity of in vitro osteoblasts. Both drugs used are nitrogen BPs; however, in the doses used, ALE affected more significantly the mineralized matrix formation.

Recebido em: 07/03/2019

Aprovação final em: 18/05/2019

DOI: <https://doi.org/10.25061/2527-2675/ReBram/2019.v22i3.728>

INTRODUÇÃO

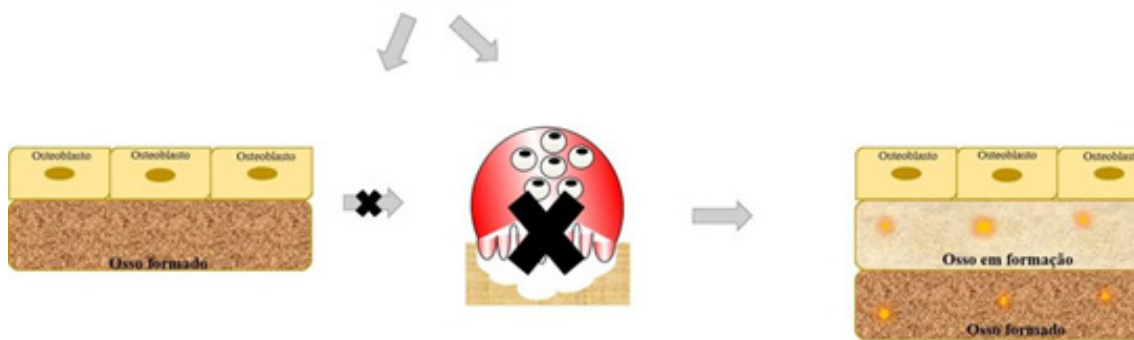
Os bifosfonatos (BPs) são antirreabsortivos utilizados para o tratamento de patologias relacionadas à perda óssea, sendo, na maioria das vezes, a primeira escolha para tratamento de doenças como osteoporose, doença de Paget e metástases ósseas (BASSO *et al.*, 2013; FERREIRA JÚNIOR; CASADO; BARBOZA, 2007).

Os BPs agem em âmbitos tecidual, celular e molecular. Em termos teciduais, esses medicamentos afetam o *turnover* (Figura 1) ósseo, isso pode ser analisado de acordo com a diminuição de reabsorção e de formação óssea, que fazem parte do processo de remodelação óssea, essa ligação pode ser denominada de “acoplamento” (RODAN; FLEISCH, 1996), podendo ser compreendido a partir dos efeitos dos BPs nas células ósseas. Apesar do alvo final desses antirreabsortivos ser o osteoclasto (RODAN; FLEISCH, 1996), os BPs nitrogenados, tais como o alendronato de sódio e o ácido zoledrônico, agem não só inibindo-os diretamente, como também paracrinamente, via osteoblastos, que são induzidos a produzir fatores de inibição que, por sua vez, levam à redução da reabsorção óssea (KING; UMLAND, 2008; RUGGIERO; WOO, 2008). Em âmbito molecular, sabe-se que a ação dos BPs acontece por meio de receptores de superfície ou enzimas intracelulares (RUGGIERO *et al.*, 2004). Em um estudo *in vitro* com osteoblastos expostos ao ácido zoledrônico, em altas concentrações, observou-se uma redução na liberação de fosfatase alcalina enzima que apresenta papel crucial na formação de matriz óssea. Por outro lado, concentrações mais baixas não afetaram significativamente os osteoblastos (BASSO *et al.*, 2013). Mesmo diante da inibição de osteoclastos, os osteoblastos continuam formando osso, sem que os restos necróticos sejam reabsorvidos, o que resulta em um osso frágil e quebradiço (KING; UMLAND, 2008) (Figura 1), com um arranjo irregular do colágeno e, conseqüentemente, com algumas propriedades mecânicas comprometidas (VERZOLA, 2016).

Apesar da eficácia comprovada dos antirreabsortivos da classe dos BPs no que diz respeito ao aumento da densidade óssea (WALTER *et al.*, 2010; VERZOLA, 2016), estas drogas apresentam efeitos colaterais conhecidos, tais como: dores ósseas, musculares e alterações nos tratos digestório e renal. Em 2003, a relação dos BPs com a osteonecrose dos maxilares foi descrita (MARX, 2003) e, desde então, diversos casos têm sido relatados em todo o mundo (BASSO *et al.*, 2013). A osteonecrose dos maxilares causada pelo uso de medicamentos [“medicine drug related osteonecrosis of the jaw (MRONJ)”], tais como os antirreabsortivos, caracteriza-se pela presença de exposição óssea ou osso que pode ser examinado por meio uma fístula intra ou extraoral na região dos maxilares, persistente por mais de 8 semanas, durante ou após tratamento com BPs, sem histórico de radioterapia na região maxilofacial (RUGGIERO, 2014). Esse efeito adverso de difícil resolução tem mecanismos desconhecidos, causa destruição severa nos maxilares (MIGLIORATI, 2006) e sua gravidade varia de acordo com a via de administração, a dose, a frequência e o tempo de uso do medicamento (BASSO, 2013; FERREIRA JÚNIOR; CARDOSO; BARBOZA, 2007; ALIJOHANI *et al.*, 2017; FASSIO *et al.*, 2017).

Considerando que a MRONJ, patologia óssea multifatorial de difícil tratamento (FASSIO *et al.*, 2017), pode ser desencadeada por tratamentos odontológicos envolvendo tecido ósseo, como doença periodontal, lesões periapicais, instalação de implantes, cirurgia oral, e extrações (ALIJOHANI *et al.*, 2017; FASSIO *et al.*, 2017; NICOLATOU-GALITIS *et al.*, 2019), sendo a última responsável por mais de 50% dos desencadeamentos da enfermidade, pode-se considerar também a ocorrência espontânea (RUGGIERO, 2014; KUROSHIMA; SASAKI; SAWASE, 2019), o propósito deste estudo consistiu em analisar a capacidade de diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais (CTMs) de ratos que foram tratados cronicamente com alendronato de sódio ou ácido zoledrônico.

Figura 1 - Principais mecanismos de ação dos bifosfonatos (BPs).



Fonte: Elaboração Própria.

MATERIAL E MÉTODOS

EXPERIMENTO IN VIVO

Após a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Araraquara CEUA-UNIARA (protocolo número 023/16), 6 ratos machos adultos Wistar (*rattus norvegicus albinus*), pesando $325 \pm 0,023$ g foram mantidos no Centro de Pesquisas Biológicas/Biotério da UNIARA, em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^\circ$ C) e umidade ($55 \pm 10\%$) controladas e ciclos claro-escuro (12 horas claro-12 horas escuro), sob regime hídrico e alimentar *ad libitum*. Após o período de quarentena, os animais foram randomicamente divididos em 3 grupos, descritos a seguir.

Veículo (VEH): Os animais deste grupo receberam apenas o veículo de diluição dos medicamentos (0,009 mg/mL/kg de solução salina fisiológica - cloreto de sódio 0,9%, Eurofarma Laboratórios S.A.) por via subcutânea, uma vez por semana.

Alendronato de Sódio (ALE): os animais deste grupo receberam 1mg/mL/kg de alendronato de sódio (Phitofarma, Araraquara, SP, Brasil) diluído em solução fisiológica (Eurofarma Laboratórios S.A.), por via subcutânea, uma vez por semana (HIKITA et al., 2006; CONTE-NETO et al., 2013).

Ácido Zoledrônico (ZOL): os animais deste grupo receberam injeções subcutâneas de ácido zoledrônico (Eurofarma Laboratórios S.A., São Paulo, SP, Brasil) diluído em solução salina fisiológica (Eurofarma Laboratórios S.A.), na dosagem de 0,3 mg/mL/kg de peso corporal do animal, uma vez por semana (AGAÇAYAK et al., 2014).

Os animais dos três grupos receberam as injeções por 13 semanas consecutivas, sempre no mesmo horário, durante todo o experimento, sendo submetidos à eutanásia na 14ª semana de experimento (figura 1), por meio de sobredose de cloridrato de quetamina 10% e de cloridrato xilazina 2% (CONTE-NETO et al., 2013).

EXPERIMENTO IN VITRO

OBTENÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

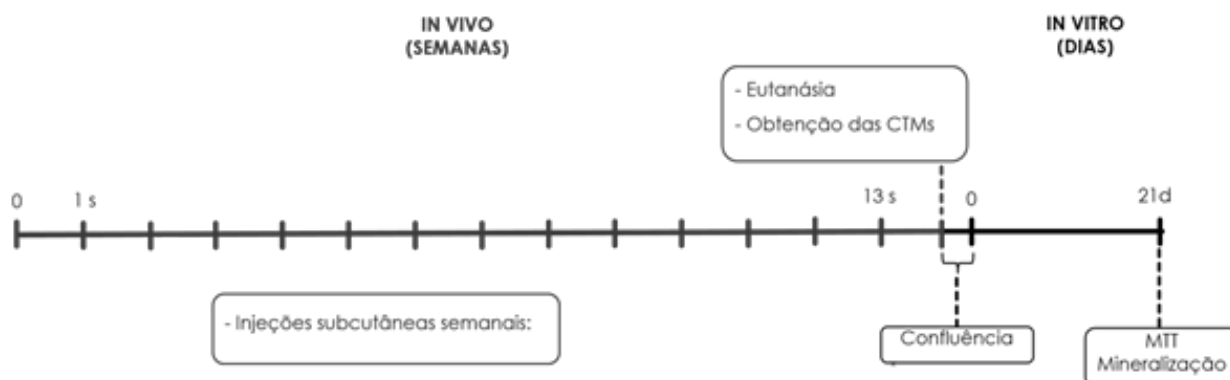
Após a eutanásia, os fêmures direitos dos animais foram removidos, dissecados com auxílio de um bisturi e mantidos em tubos Falcon (50 mL) com DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) contendo penicilina (100U/mL) e estreptomomicina (100µg/mL) (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA). Os tubos com os fêmures foram levados para o fluxo laminar previamente esterilizado por 20 minutos com luz ultravioleta. Os fêmures passaram por uma limpeza final para remoção dos tecidos moles remanescentes e tiveram as epífises proximal e distal removidas. Os elementos da medula óssea foram extraídos

por meio de *flushing*, realizado com auxílio de seringas (20mL) e agulhas (25x8) estéreis com DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A suspensão celular foi centrifugada (10.000 rpm por 4 minutos a 4° C), o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 10mL de meio, acondicionadas em garrafas de cultura de 100mL e mantidas em estufa até que entrassem em 70-80% de confluência (48- 72h). Após atingir confluência, as células foram removidas das garrafas, quantificadas e semeadas em placas de 48 poços na densidade de 5000 células/200µL/poço na presença de meio osteogênico [DMEM suplementado com ácido ascórbico, β-glicerofosfato e dexametasona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)]. As células foram mantidas em estufa a 37° C, 5% CO₂ e 95% de ar atmosférico. As trocas de meio aconteceram a cada três dias. As culturas foram realizadas por um período de 21 dias.

VIABILIDADE CELULAR

Após o período 21 dias (Figura 2), foi realizada a análise da viabilidade celular nos grupos VEH, ZOL e ALE, por meio de análise colorimétrica de redução do MTT (brometo de [[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]]), que reage com a presença de proteínas mitocondriais durante a respiração celular, ou seja, feita apenas por células vivas. Após a remoção dos meios de cultura e lavagem dos poços com PBS gelado, foi adicionado 100µL de MTT em cada poço e as placas foram levadas para a estufa durante 4 horas. Em seguida foi adicionado 100µL de isopropanol ácido em cada poço e realizada a homogeneização para solubilização completa do precipitado. Posteriormente, 50µL foi adicionado, em triplicata, em cada poço de uma placa com 96 poços, para análise colorimétrica em um leitor de microplacas (Polaris, Celer Biotecnologia, Belo Horizonte, MG, Brasil), em comprimento de onda de 570nm (MOSMANN, 1983). Os resultados são apresentados como absorbância.

Figura 2 - Linha de tempo dos experimentos in vivo e in vitro.



Fonte: Elaboração Própria.

DETECÇÃO DE ACÚMULOS DE CÁLCIO (FORMAÇÃO DE MATRIZ MINERALIZADA)

Após 21 dias de cultura, o meio de cultura dos grupos VEH, ALE e ZOL foi removido e os poços foram lavados com tampão PBS gelado e preenchidos com formaldeído 10% por um período de 30 minutos. Em seguida, os poços foram lavados com água deionizada e preenchidos com 1mL de vermelho de alizarina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), que cora em vermelho as regiões que apresentam nódulos de mineralização, ou seja, abundantes em cálcio. Após 30 minutos, os poços corados foram novamente lavados com água deionizada e secos a temperatura ambiente (12h a 24h). Em seguida foram obtidas

imagens de cada poço com auxílio de um sistema de câmera digital (TUCSEN Photonics Co. Ltd., Fujian, China) acoplado ao microscópio óptico de luz invertida (Nykon Eclipse TS100, Tokyo, Japan). Depois da secagem foi incorporado 450µL de ácido acético aos poços e as placas foram mantidas sob agitação por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 150µL de NH₄OH a 10% em todos os poços, homogeneizados e, posteriormente, 150µL de cada poço foi transferido, em triplicatas, para poços de microplacas (96 poços) para medida colorimétrica em leitor de microplacas (Polaris, Celer Biotecnologia, Belo Horizonte, MG, Brasil) em comprimento de ondas de 405nm (GREGORY et al., 2004). Os resultados são apresentados como mineralização biológica.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

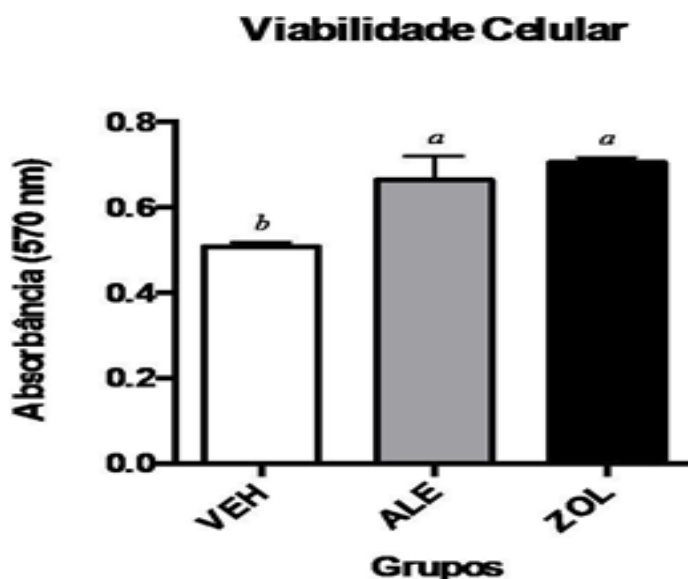
Os dados obtidos nas diferentes análises foram tabulados e submetidos à análise estatística, utilizando-se o software Graph Pad Prisma 6.0. Inicialmente foi realizado o teste de Normalidade D'Agostino & Pearson verificando-se que houve aderência dos dados à curva normal. Portanto, para as comparações intra e intergrupos foi utilizado o teste paramétrico One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Os resultados são apresentados como média ± DP (Desvio Padrão) e o nível de significância adotado foi de 1%.

RESULTADOS

VIABILIDADE CELULAR

A avaliação intergrupos do ensaio MTT revelou aos 21 dias, os grupos bifosfonatos (ALE e o ZOL) apresentaram viabilidade celular semelhantes, maiores ($p < 0,01$) que no grupo VEH, como ilustra a Figura 3.

Figura 3 - Viabilidade de células osteogênicas nos grupos VEH, ALE e ZOL, aos 21 dias de cultura. Valores apresentados em média ± DP. Letras minúsculas indicam diferenças entre os grupos ($a > b$). One Way ANOVA e pós-teste de Tukey. $p < 0,01$.

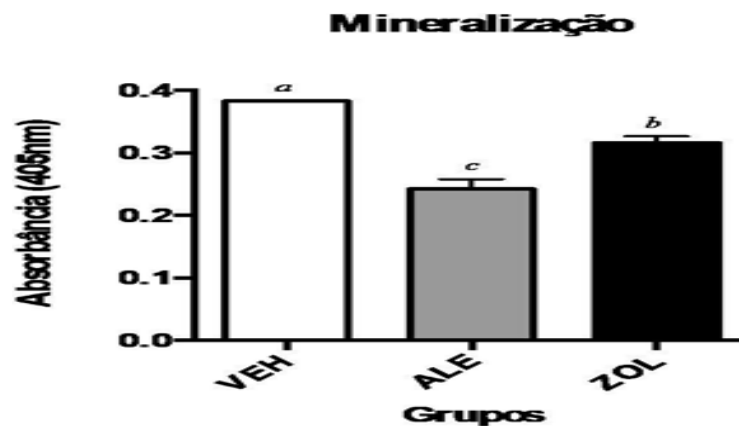


Fonte: Elaboração Própria.

FORMAÇÃO DE MATRIZ MINERALIZADA

Nas análises intergrupos, a análise da absorbância das amostras após a extração de alizarina, mostrou que o grupo VEH apresentou maior formação de matriz mineralizada que os grupos ALE e ZOL ($p < 0,001$). Comparando-se os grupos bifosfonatos entre si, aos 21 dias, o grupo ZOL mostrou maior formação de matriz mineralizada que o grupo ALE ($p < 0,001$), como ilustra a Figura 4.

Figura 4 - Quantificação de vermelho de alizarina em culturas de células osteogênicas nos grupos VEH, ALE e ZOL, aos 21 dias de cultura. Valores apresentados como média \pm DP. As letras indicam diferenças entre os grupos ($a > b > c$). One Way ANOVA e pós-teste de Tukey. $p < 0,001$.



Fonte: Elaboração Própria.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que osteoblastos provenientes de CTMs de ratos tratados com BPs podem apresentar diferenças na viabilidade e na formação de matriz mineralizada, quando comparados às células de animais que não receberam BPs. Além disso, mesmo que tanto o alendronato de sódio quanto o ácido zoledrônico, sejam BPs nitrogenados, eles afetaram diferentemente os parâmetros avaliados.

Apesar dos BPs, fármacos antirreabsortivos, atuarem principalmente nos osteoclastos, tendo-os como alvo final, a ação desses medicamentos em osteoblastos tem sido demonstrada em diversos experimentos *in vitro* (ALQHTANI *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2016; REINHOLZ *et al.*, 2000). O tratamento dos animais com ALE ou ZOL por 13 semanas, determinou viabilidade celular semelhante nos grupos BPs, que foram maiores que no grupo VEH. Assim como este estudo, outras investigações mostram que os BPs afetam a viabilidade de osteoblastos (BASSO *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2016). Quanto à matriz mineralizada, a maior formação de nódulos de mineralização foi observada no grupo VEH em comparação aos grupos ALE e ZOL. Esses dados corroboram com os estudos prévios, que também mostraram um declínio na formação de matriz mineralizada pelas células em contato com BPs (WALTER *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2016). Cabe ressaltar que, mesmo que ambos os medicamentos sejam BPs nitrogenados, foi possível notar que, em alguns períodos, eles afetaram diferentemente os parâmetros avaliados. Talvez isso possa ser explicado pelo fato desses medicamentos apresentarem diferentes potências antirreabsortivas (alendronato: >100 e <1000 e ácido zoledrônico: >10000) ((FERNANDES *et al.*, 2005), o que se deve a diferenças em sua estrutura química. Além disto, é importante considerar as diferenças em sua formulação para administração em pacientes: o alendronato de sódio é administrado por via oral,

enquanto o ácido zoledrônico por via endovenosa (MIGLIORATI et al., 2006).

A avaliação *in vitro* de diferentes doses de BPs indica que o efeito desses fármacos nas células ósseas é dose dependente (NAIDU et al., 2008). As doses dos medicamentos utilizados no presente estudo foram baseadas em estudos prévios em que animais tratados com alendronato de sódio (HIKITA et al., 2009; CONTE-NETO et al., 2013) ou ácido zoledrônico (AGAÇAYAK et al., 2014) apresentaram MRONJ. Deste modo, essas doses que foram efetivas para indução de MRONJ também influenciaram a viabilidade de osteoblastos, bem como a produção de matriz mineralizada por essas células.

Apesar de nossos resultados serem semelhantes aos de estudos prévios em relação aos efeitos dos BPs em osteoblastos, esta investigação diferiu da maioria (KOCH et al., 2012; BASSO et al., 2013; WALTER et al., 2010; REINHOLZ et al., 2000), visto que empregou um modelo *ex vivo*, em que células que ficaram sob a ação do alendronato de sódio ou do ácido zoledrônico durante 13 semanas, não entraram em contato com esses fármacos em cultura. Considerando que o metabolismo de ratos parece ser mais acelerado que do ser humano, o período de 13 semanas empregado neste estudo equivaleria a um maior tempo no homem (WANCKET, 2012; FLEISCHER; KONTIO; OTTO; 2016), porém, provavelmente, inferior ao de 3 anos considerado como sendo de risco para a ocorrência de MRONJ desencadeada pelo tratamento odontológico cirúrgico (MARX, 2003). Mesmo diante disso, do intervalo de 1 semana entre a última administração dos BPs (13^a semana) e a obtenção das CTMs (14^a semana) e da ausência da hidroxiapatita nas culturas para religação dos BPs (RUGGIERO, WOO 2008), quando comparamos os grupos BPs com o grupo VEH, ficam evidentes os efeitos decorrentes do contato prévio das células osteoblásticas com os fármacos. *In vitro*, CTMs humanas provenientes de regiões de MRONJ apresentaram menor capacidade de proliferação e diferenciação, o que talvez possa explicar a dificuldade de reparo de regiões de MRONJ (KING; UMLAND, 2008).

Correlacionando-se o presente estudo com a clínica odontológica, foi realizada uma tentativa de simulação de uma condição em que o paciente não estava mais utilizando BPs, mas, teve suas células osteogênicas previamente expostas a ele. Os resultados obtidos indicam que mesmo após a suspensão dos BPs nitrogenados, é possível que esses medicamentos continuem exercendo efeito nas células ósseas (RUGGIERO; WOO, 2008; RUGGIERO et al., 2014). Estes dados associados ao fato da MRONJ não ter suas causas elucidadas, reforçam a importância de uma cuidadosa anamnese para investigação do uso de BPs por pacientes a serem submetidos ao tratamento odontológico, conduta esta, que pode auxiliar na prevenção da MRONJ (CARLSON; BASILE, 2009; CARLSON, 2014; JABBOUR et al., 2012).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que osteoblastos provenientes de células-tronco mesenquimais de medula óssea de ratos tratados com alendronato de sódio ou com ácido zoledrônico podem apresentar alterações no que diz respeito à viabilidade e à formação de matriz mineralizada, quando comparados a osteoblastos provenientes de CTMs de animais que não receberam BPs. Apesar de ambos os medicamentos utilizarem-se de BPs nitrogenados, na dose empregada, o ALE afetou mais significativamente a formação de matriz mineralizada.

REFERÊNCIAS

AGAÇAYAK, K.S. et al. Long-term effects of antihypertensive medications on bone mineral density in men older than 55 years. **Clinical Interventions in Aging**. v.27, n.9, p.13-509, mar.2014.

ALIJOHANI S. et al. What is the effect of anti-resorptive drugs (ARDs) on the development of medication-

related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) in osteoporosis patients: A systematic review. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**. v.9, n.45, p.1502-1493, set.2017.

ALQHTANI, N.R. et al. Low dose effect of bisphosphonates on hMSCs osteogenic response to titanium surface in vitro. **Bone reports**. v.6, n.16 p.6-64, jun.2017.

BASSO, F.G. et al. Zoledronic acid inhibits human osteoblast activities. **Gerontology**. v.59, n.6, p.541-534, out.2013.

CARLSON, E.R., BASILE, J.D., The role of surgical resection in the management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v.67, n.5, p.85-95, mai.2009.

CARLSON, E.R. Management of antiresorptive osteonecrosis of the jaws with primary surgical resection. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v.72, n.4, p.7-655, abr.2014.

CONTE-NETO, N. et al. Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rodents. **International Journal of Experimental Pathology**. v.94, n.1, p.65-73, fev.2013.

FERNANDES, C. et al. Bifosfonatos: Sínteses, análises químicas e aplicações farmacológicas. **Química Nova**. v.28, n.2, p.80-274, fev.2005.

FASSIO A. et al. Drug-induced osteonecrosis of jaw: a state of the art. **Reumatismo**. v.1, n.69, p.9-15, mai.2017.

FERREIRA JÚNIOR, C.D.; CASADO, P.L.;BARBOZA, E.S.P. Osteonecrose associada aos bifosfonatos na odontologia. **Revista Periodontia**. v.17, n.4, p.24-30, dec.2007.

FLEISCHER, K.E.; KONTIO, R.; OTTO, S. **Antiresorptive drug-related osteonecrosis of the jaw (ARONJ) – a guide to research**, 2016.

GREGORY, C.A. et al. An alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: Comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Analytical Biochemistry**. V.329, p.77-84, jun. 2004.

HIKITA, H. et al. Bisphosphonate administration prior to tooth extraction delays initial healing of the extraction socket in rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**. v. 27, n.6, p.72-663, mai.2009.

HUANG, X. et al. Dose-dependent inhibitory effects of zoledronic acid on osteoblast viability and function in vitro. **Molecular medicine reports**. v.13, n.1, p.22-613, jan.2016.

JABBOUR, Z. et al. The outcomes of conservative and surgical treatment of stage 2 bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a case series. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v.41, n.11, p.9-1404, nov.2012.

KING A.E.; UMLAND E. Osteonecrosis of the jaw in patients receiving intravenous or oral bisphospho-

nates. **Pharmacotherapy**. v.28, n.28, p.88-668, mai.2008.

KOCH, F.P. et al. Influence of biphosphonates on the osteoblasts RANKL and OPG gene expression in vitro. **Clinical Oral Investigations**. v.16, n.1, p.79-86, fev.2012.

KUROSHIMA S., SASAKI M., SAWASE T. Medication-related osteonecrosis of the jaw: a literature review. **Journal of Biosciences**. v.61, n., p.99-104, jun.2019.

MAAHS, Márcia A. Peter. **Associação entre o uso de bifosfonatos e osteonecrose dos maxilares: Estudo em ratos**. 2008. Tese (Doutorado em Concentração em Estomatologia Clínica) – Faculdade de Odontologia, Pontífica Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MANIATOPOULOS, C. et al. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. **Cell and Tissue Research**. v. 2, n.254, p.30-17, nov.1988.

MARX, R.E. Pamidronate (Aredia) and zolendronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v. 61, n.9, p.7-1115, set.2003.

MIGLIORATI, C.A, et al. Managing the care of patients with bisphosphonate- associated osteonecrosis An American Academy of Oral Medicine position paper. **Journal of the American Dental Association**. v.136, n.12, p.68-1658, jan.2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological. Methods**. V.65, n.1-2, p.55-63, dec.1983.

NAIDU, A. et al. The effects of bisphosphonates in osteoblasts in vitro. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v.106, n.1, p.5-13, jul.2008.

NICOLATOU-GALITIS O., et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw: definition and best practice for prevention, diagnosis and treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**. v.2, n.127, p.117-135. Fev.2019.

PASSERI L.A., BÉRTOLO M.B., ABUABARA A. Osteonecrose dos maxilares relacionada ao uso de bifosfonatos. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v.4, n.51, p.7-40. Abr.2011.

REINHOLZ, G.G. et al. Biphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. **Cancer Research**. v.60, n.21, p.7-6001, nov.2000.

RODAN, G.A.; FLEISCH, H.A. Biphosphonates: Mechanisms of action. **Journal of Clinical Investigation**. v. 97, n.12, p.6-2692, abr.1996.

RUGGIERO, S.L. et al. American association of oral and maxillofacial surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw—2014 update. **Journal of the American Dental Association**.

MATEUS *et al.*

v.72, n.10, p.56-1938, out.2014.

RUGGIERO, S.L. et al. Osteonecrosis of the jaw associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. **Journal of the American Dental Association**. v. 62, n.5, p.34-527, mai.2004.

RUGGIERO, S.L.; Woo S.B. Biphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. **Dental Clinics of North America**. v.52, n.1, p.28-111, jan.2008.

SCHWARTZ, H.C. American association of oral and maxillofacial surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw – 2014 update and CTX. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v.73, n.3, p.8-377, mar.2015.

SHOJI, S. et al. Biphosphonates inhibits bone turnover in OPG (-/-) mice via a depressive effect on both osteoclasts and osteoblasts. **Calcified Tissue International**.v.87, n.2, p.92-181, ago.2010.

VERZOLA, Mário H. Arruda. **Efeito da administração de alendronato, a longo prazo, sobre as propriedades mecânicas do tecido ósseo, sua reparação e mineralização ao redor de implantes osseointegráveis. Estudo em ratas**. 2014. Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade estadual paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Odontologia de Araraquara, São Paulo.

VERZOLA, M.H.A. et al. Effects of the long-term administration of alendronate on the mechanical properties of the basal bone and on osseointegration. **Clinical Oral Implants Research**. v. 26, n. 12, p. 1466-1475, out.2016.

WALTER, C. et al. Influence of bisphosphonates on endothelial cells, fibroblasts, and osteogenic cells. **Clinical Oral Investigations**. v.14, n.1, p.35-41, fev.2010.

WANCKET, L.M. Animal models for evaluation of bone implants and devices: comparative bone structure and common model uses. **Veterinary Pathology**. v.52, n.5, p.50-842, set.2015.