



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

ANA CAROLINA DE LIMA SILVA

**ANÁLISE MICRO-TOMOGRAFICA DO POTENCIAL
OSTEOCONDUTOR DO BETATRICÁLCIO FOSFATO NO
REPARO ALVEOLAR DE RATOS TRATADOS COM ÁCIDO
ZOLEDRÔNICO**

ARAÇATUBA - SP
2020

ANA CAROLINA DE LIMA SILVA

**ANÁLISE MICRO-TOMOGRAFICA DO POTENCIAL
OSTEOCONDUTOR DO BETATRICÁLCIO FOSFATO NO
REPARO ALVEOLAR DE RATOS TRATADOS COM ÁCIDO
ZOLEDRÔNICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Francisley Ávila Souza.

ARAÇATUBA - SP
2020

Aos meus pais, Sidnei da Silva e Márcia de Lima Silva, por tudo que fizeram e continuam fazendo por mim. Eterna gratidão por todo apoio e por sempre me incentivarem no meu sonho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por ter pensado direitinho em tudo que realizou na minha vida nesses últimos anos, me mostrando como tudo o que faz é perfeito e calculado. Grata por todas as pessoas que colocou na minha vida e por todas que deixou permanecer.

Ao meu pai, que sempre me apoiou em todas as minhas decisões e fez coisas impossíveis para que eu realizasse meus sonhos, que é o meu maior apoiador e meu exemplo.

A minha mãe, que sempre esteve ao meu lado. Que sempre estava pronta a atender uma ligação em qualquer horário, por sempre me ouvir e por nunca ter me deixado desistir. Mãe, você é minha inspiração.

Aos meus avós maternos, Maria do Carmo e Aparecido, por me ajudarem sempre que precisei, por todo apoio, carinho.

A minha avó paterna, Salete, por todo carinho e por sempre rezar por mim.

Ao meu avô paterno, Moacir, que infelizmente, não conseguiu ver essa conquista fisicamente, mas sei que está feliz e orgulhoso olhando por mim lá no céu. O senhor é um exemplo de vida.

Aos meus familiares, que sempre se mostraram orgulhosos de mim fazendo com que eu tivesse força pra correr atrás dos meus sonhos e batalhar pra ser uma pessoa/profissional melhor.

Professor Dr. Francisley, meu querido orientador, por ter me dado a oportunidade de participar de um projeto de pesquisa, por todo incentivo e por sempre querer o melhor para seus orientandos.

Ao doutorando, Henrique, sem sua ajuda isso aqui não teria saído de jeito nenhum, por todo carinho, paciência e disponibilidade, além de toda força e vontade que sempre demonstrou, sendo, para mim, um exemplo a seguir na profissão.

A professora Daniela, por prontamente aceitar o convite de participar desse momento e pelo carinho que tem com os alunos.

Ao professor Juliano Milanezi e ao doutorando Henrique Rinaldi, que enriqueceram nossa pesquisa com seus conhecimentos e colaboração.

A Isadora e a Camila, que dividiram comigo, boa parte da faculdade, o mesmo teto, que me acolheram muito bem, e se tornaram grandes amigas

A “Turma do pagode” Livia, Bia, Guilherme, Leonardo, Carolina, Gabriel, Amanda Borges, Amanda Maslem, Ana Maira, Kato, João Matheus, Matheus... grupo que se formou por um trabalho da faculdade, foi conquistando agregados e se tornou uma família. Obrigada por tudo.

As meninas, Fernanda, Mirela, Giovana, Stefani, Julia, Carol ... por estarem comigo em todas as conquistas, e nunca negarem um ombro amigo

As minhas amigas de infância, Giovana, Lais, Luana e Camila que, apesar da distância, continuamos nos apoiando após tantos anos. “Se a amizade é verdadeira, a distância não separa, o amor não enfraquece e ninguém substitui.”

A comissão de formatura, que me aproximou de pessoas incríveis, que eu tenho muita admiração. Apesar das diferenças, me ensinaram o que é trabalho em equipe e que somos capazes de fazer muito.

A turma 62: apesar das diferenças, não poderia ter tido melhores companheiros. Sentirei saudades!

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP por ter me proporcionado experiências incríveis e me concedido uma formação impecável

A todos os professores que passaram por mim, contribuindo para formação da profissional que eu sou/quero ser.

A todos os pacientes, por confiarem em meu trabalho e compreenderem nossas dificuldades.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

SILVA, A. C. L. **Análise micro tomográfica do potencial osteocondutor do betatricalcio fosfato no reparo alveolar de ratos tratados com ácido zoledrônico.** 2020. 31 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

RESUMO

A osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos (OMIM) é descrita como, osso exposto que persiste por mais de 8 semanas em pacientes tratados com anti reabsortivos ou agentes antigioogênicos e sem terapia de radiação prévia ou doença metastática dos maxilares. Os anti reabsotivos mais comumente prescritos pertencem a classe dos bifosfonatos, que são utilizados em casos como osteoporose, e o tratamento dessa complicação representa um desafio para a odontologia. Sendo assim, o objetivo deste projeto foi avaliar a prevenção da OMIM com o uso de β - tricálcio fosfato durante reparo alveolar de molares inferiores de ratos. Após aprovação do Comitê de ética em uso animal (CEUA), 16 ratos wistar foram tratados com aplicação de ácido zoledrônico por via intra-peritoneal por sete semanas, seguindo um intervalo de 2 dias entre as aplicações e posteriormente tiveram seus molares inferiores direitos removidos. Posteriormente, os animais foram divididos em 2 grupos: GC, que teve o alvéolo preenchido apenas por coágulo e GB com o alvéolo preenchido com biomaterial. Passados 36 dias das exodontias de todos os animais, foram submetidos a eutanásia com dose excessiva de anestésico, tiopental sódico (150m g/kg) e lidocaína 2% (10 mg/kg). Realizou-se a ressecção em bloco da região alveolar dos molares para análise microtomográfica. Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 BrukerMicroCT Versão 1.12.4.0) foi avaliado e mensurado o volume ósseo (BV), porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), separação e número de trabéculas (TB.Sp e Tb.N), para então realizar a reconstrução em 3D pelo software CTvox (SkyScan, Versão 2.7). Na análise de microCT o grupo GC mostrou formação de sequestro ósseo, além de atraso no reparo alveolar. Já no GB houve melhora no reparo ósseo e maior volume alveolar, concluindo que o biomaterial se mostrou eficiente na manutenção do volume alveolar de ratos tratados com zoledronato.

Palavras-chave: Osteonecrose. betatricalcio. Alvéolo dental.

SILVA, A. C. L. **Microtomographic analysis of the osteoconductive potential of betatricalcio phosphate in the alveolar repair of rats treated with zoledronic acid.** 2020. 31 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

ABSTRACT

Drug-induced osteonecrosis of the jaws (OMIM) is described as, exposed bone that persists for more than 8 weeks in patients treated with anti-resorptive or antigenic agents and without previous radiation therapy or metastatic disease of the jaws. The most commonly prescribed anti-resorptives belong to the class of bisphosphonates, which are used in cases such as osteoporosis, and the treatment of this complication represents a challenge for dentistry. Therefore, the objective of this project will be to evaluate the prevention of OMIM with the use of β -tricalcium phosphate during alveolar repair of lower molars of rats. After approval by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA), 16 wistar rats were treated with application of zoledronic acid intraperitoneally for seven weeks, following an interval of 2 days between applications and later their right lower molars were removed. Subsequently, the animals were divided into 2 groups: CG, which had the alveolus filled only by clot and GB with the alveolus filled with biomaterial. 36 days after the extractions of all animals, they were euthanized with an overdose of anesthetic, sodium thiopental (150mg / kg) and 2% lidocaine (10 mg / kg). A block resection of the alveolar region of the molars was performed for microtomographic analysis. Then, using the CTAnalyser - CTAn software (2003-11SkyScan, 2012 BrukerMicroCT Version 1.12.4.0) bone volume (BV), percentage of bone volume (BV / TV), thickness of bone trabeculate (Tb.Th) was evaluated and measured), separation and number of trabeculae (TB.Sp and Tb.N), to then perform the 3D reconstruction using the CTvox software (SkyScan, Version 2.7). In the microCT analysis, the GC group showed formation of bone sequestration, in addition to delayed alveolar repair. In GB, there was an improvement in bone repair and greater alveolar volume, concluding that the biomaterial proved to be efficient in maintaining the alveolar volume of rats treated with zoledronate.

Keywords: Osteonecrosis. Betatricalcio. Dental alveolus.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Linha do tempo representando o fluxograma de trabalho 16
- FIGURA 2** - Imagem representativa do procedimento experimental; A) Posição do animal em mesa de operação personalizada; B) Alvéolo recém operado; C) Primeiro molar inferior direito após a exodontia; D) Alvéolo preenchido por coágulo (GC) após a extração; Alvéolo preenchido por biomaterial (GB); F) Sutura após a exodontia 17
- FIGURA 3** - Esquema de distribuição dos animais nos grupos da análise 18
- FIGURA 4** - Imagem obtidas através da análise micro-tomográfica (Micro-CT); A) Visão sagital da reconstrução 3D do alvéolo do grupo GC no pós-operatório, evidenciando a presença de um sequestro ósseo; B) Corte parassagital da peça, demonstrando alvéolo em fase de reparo com a presença de sequestro ósseo; C) Visão coronal da reconstrução 3D do alvéolo no grupo controle 20
- FIGURA 5** - Imagem obtidas através da análise micro-tomográfica (Micro-CT); A) Visão sagital da reconstrução 3D do alvéolo do grupo GB no pós-operatório, evidenciado o processo de reparo e manutenção do volume alveolar; B) Corte parassagital da peça, demonstrando alvéolo em fase de reparo; C) Visão coronal da reconstrução 3D do alvéolo no grupo controle, onde nota-se reparo tecidual e resíduos do biomaterial no interior do alvéolo 21
- FIGURA 6** - Gráfico que expressa em valores quantitativos obtidos através da análise por microtomografia para mensuração do volume ósseo (BV), porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (TB.Th), separação de trabéculas (TB.SP) número de trabéculas (TB.N) e porosidade (PO.TOT) 21

LISTA DE ABREVIATURAS

AAOMS	American Association of Oral and Maxilofacial
BPs	Bifosfonatos
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
OMIM	Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Medicamento
PDT	Terapia Fotodinâmica
ZOE	Ácido Zoledrônico
B-TCP β	Tricalcio Fosfato

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	OBJETIVO.....	14
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4.	RESULTADOS	20
5.	DISCUSSÃO	22
6.	CONCLUSÃO.....	24
	REFERÊNCIAS	25
	ANEXOS	31

1 INTRODUÇÃO

A osteonecrose é uma condição clínica caracterizada pela exposição óssea que persiste por um período maior que 8 semanas em pacientes que fazem uso de fármacos classificados como antirreabsortivos ou agentes antigengênicos, contudo esses pacientes não devem ter recebido terapia de radiação prévia ou doença metastática dos maxilares.¹

Sendo assim, passou-se a definir essa condição como osteonecrose dos maxilares induzido por medicamento (OMIM). Em 2003, um estudioso da área publicou pela primeira vez casos clínicos de pacientes que faziam uso de (bifosfonatos) BPs e foram submetidos ao procedimento de extração dentária (trauma mecânico).²

Os antirreabsortivos mais comumente prescritos pertencem a classe dos BPs e são utilizadas em tratamentos de doenças que causam o aumento da reabsorção óssea, como osteoporose e metastase óssea.^{3,4} Sua forma de ação consiste em diminuir a taxa de remodelação óssea e impedir que os osteoclastos realizem absorção óssea e induzam sua apoptose.^{5,6}

Apesar de seus efeitos conhecidos no tratamento da osteoporose, os BPs, quando usados por longos períodos de tempo, possuem relatos de indução de osteonecrose.^{7,8} Há a possibilidade do uso prolongado e em altas doses desses medicamentos inibirem a possibilidade de turnover ósseo fazendo com que a força óssea e a capacidade de resposta a lesões locais fossem diminuídas ou anuladas. (5,9) teoria aprovada em modelos animais. Os mecanismos fisiológicos da osteonecrose ainda incertos, são relacionados à alteração da remodelação óssea e/ou aumento da mineralização do tecido local.^{8,9}

Não há dúvidas sobre os benefícios desses medicamentos no tratamento das doenças, no entanto seu uso prolongado pode trazer prejuízos, como uma maior chance de desenvolver a OMIM principalmente após traumas aos ossos maxilares, como extrações dentárias.¹⁰ Os BPs que mais mostram relação com a OMIM são pamidronato e ZOE, e os efeitos desses medicamentos quando administrados por via intravenosa parece ser a forma mais danosa.¹¹

Um estudo em modelo animal realizado por Rubira-Bullen e col. Demostram que o uso ZOE aumenta o volume e densidade óssea, assim como

trabéculas e diminui os espaços entre elas, levando a diminuição dos canais nutritivos e da densidade dos ossos sanguíneos.¹²

Outro estudo realizado por Williams e col. mostraram que a quantidade de lacunas e de osso necrótico teve aumento significativo em grupos tratados com drogas das classes dos BPs. Além do aumento da ocorrência de osteonecrose, presença de infiltrado inflamatório, colônias microbianas, diminuição do número de osteoclastos, e aposição mineral diminuída.¹³

Com base em relatos da AAOMS, os tratamentos da OMIM consistem em eliminar a dor, controlar a infecção e prevenir a progressão ou ocorrência de necrose óssea.¹⁴

A terapia da OMIM pode ser de grande duração, por vezes deixar sequelas no paciente ou ainda não ter sucesso. Elas podem contar com antibioticoterapia ou medidas cirúrgicas conservadoras, ou não.¹⁵ A taxa de sucesso em tratamentos cirúrgicos é maior do que os tratamentos feitos somente com antibioticoterapia.¹⁶

A antibioticoterapia é uma medida profilática útil quando se tenta inibir o aparecimento da osteonecrose em casos de pacientes submetidos a extração dentária ou implantes, que são usuários de BPs.¹⁷ No entanto, após o aparecimento da doença, existe outros métodos que tentam reverter o caso, bem como de curetagem e / ou sequestrectomia à ressecção da mandíbula.¹⁸

Estudos mostram cicatrização completa em cerca de 90% dos pacientes tratados com antibióticoterapia e submetidos a sequestrectomia, debridamento e curetagem óssea posteriormente.¹⁹ Contudo, existem casos em que tratamentos conservadores não surtem efeitos desejados no tratamento da OMIM, por exemplo, quando ocorre destruição óssea progressiva.^{20,21}

Outra forma de tratamentos é a PDT, ou seja, interação entre uma luz não térmica com um comprimento de onda específico e um fotossensibilizador.¹⁷ É conhecida por uma boa atividade microbicida, comprovada em estudos *in vitro* e *in vivo*^{22,23} além de já ter apresentado vários resultados favoráveis no tratamento da OMIM, no entanto, ainda não consta como tratamento para esta condição. Estudos mostram que a PDT, quando usada em baixas intensidades pode ser uma medida profilática a OMIM. O mecanismo da terapia com laser ainda não é totalmente

conhecido, mas sabe-se que efeitos secundários estimulam a proliferação celular.²⁴ Estudos em modelos animais mostram a melhora do reparo pós extração dentária^{25,26} estudos em humanos também mostram efeitos positivos.^{27,28}

Há também a Ressecção mandibular onde a continuidade mandibular foi quebrada e reconstruída com uma placa de reconstrução e ressecção marginal, em que o alvéolo foi ressecado sem a perda da mandíbula. Normalmente realizada quando grandes áreas de ossos necróticos estavam presentes na mandíbula. No caso da maxila, maxilectomia parcial é realizada.²⁹

2 OBJETIVO

O presente trabalho avalia a prevenção da osteonecrose induzida por meio de infusão endovenosa do ácido zoledrônico analisando o potencial osteocondutor do biomaterial de β -tricálcio fosfato no reparo alveolar de molares inferiores de ratos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi iniciado após aprovação do Comitê de ética no uso de animais – CEUA (Processo FOA nº 00810-2018), da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (ANEXO A).

3.1 Animais

Foram utilizados 16 ratos albinus wistar machos com 3 meses de idade e peso aproximado de 350-450g. Os animais foram mantidos em biotério próprio da UNESP com controle da temperatura e luz do ambiente. Os animais foram alimentados com ração e água ad libitum. Para determinação do poder da amostra foi considerado um nível de significância de 5% (com desvio padrão de 2%), e com um poder de teste de 80%, sendo definido alpha como 0,05, e oito ratos por grupos (n=8) foram necessários com finalidade de comparar os diferentes grupos.

3.2 Aplicação do ácido zoledrônico

Todos os animais foram tratados com o uso do ZOE (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil).

Seguindo o modelo experimental de Curra et al.³⁰ onde foram administradas 04 aplicações de 0,035 mg/kg de ZOE dissolvido em 0,1ml de veículo (NaCl 0,9%), por animal, através da veia caudal, com intervalos de 15 dias entre as aplicações. Uma semana após a última aplicação, os animais tiveram seus molares inferiores direitos removidos e o tratamento realizado. Após a exodontia, os animais seguiram o tratamento com a medicação, seguindo o mesmo protocolo descrito acima, até o período de eutanásia.

FIGURA 1 - Linha do tempo representando o fluxograma de trabalho



Fonte: Autor 2020

3.3 Grupos experimentais

Após tratamento com o uso do ZOE (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil) os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos, de acordo com o tratamento que receberam, tiveram seus primeiros molares inferiores direito extraídos.¹⁵

Grupo Controle (GC): Os animais sofreram a exodontia do primeiro molar inferior direito após o tratamento com ZOE (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil), porém nenhum outro tratamento foi realizado e o alvéolo foi preenchido apenas por coágulo sanguíneo;

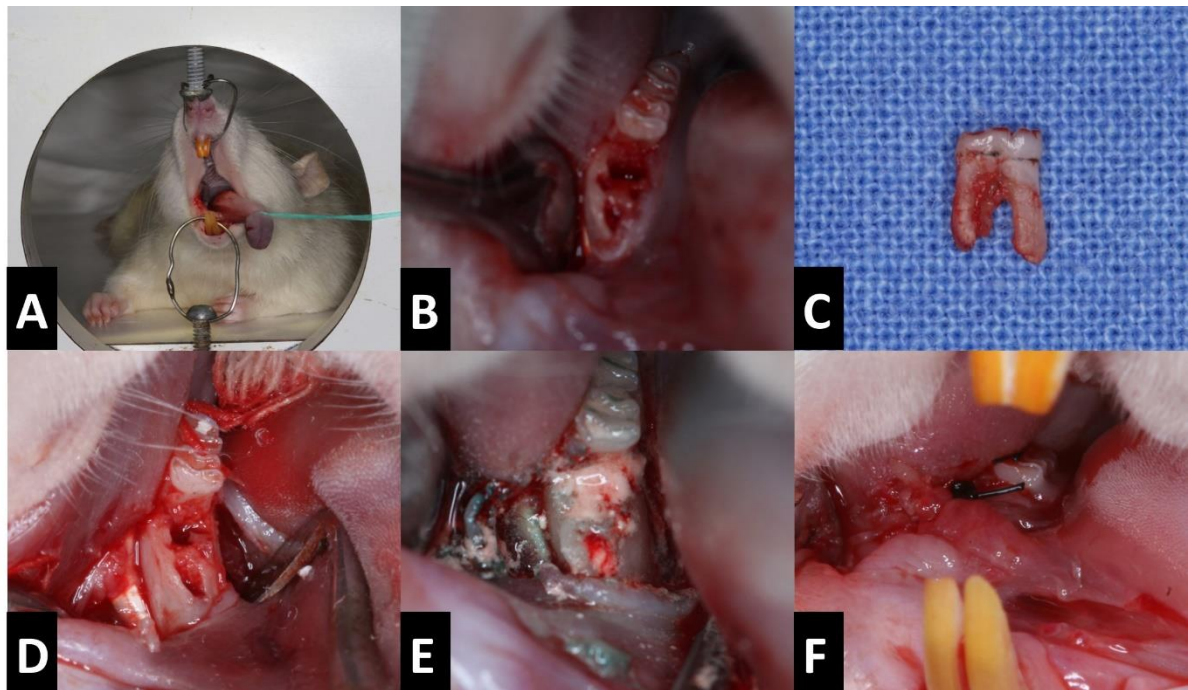
Grupo Biomaterial (Gβ): Foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior direito após o tratamento com ZOE (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil) e os animais serão tratados com o preenchimento do alvéolo por β-TCP em pasta (Graftys HBS, Latin American Solutions - LAS Brazil);

3.4 Extração dentária

Todos os animais tiveram seus primeiros molares inferiores direitos extraídos na 7ª semana após o início do protocolo de indução de OMIM. O procedimento cirúrgico foi realizado sob sedação com injeção intraperitoneal (IP) de 90mg/kg de Cloridrato de ketamina (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brasil), e 10mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do

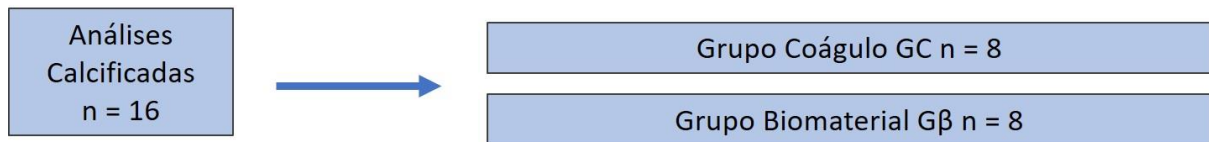
Brasil Ltda, São Paulo, Brasil)). Após sedação realizou-se a anti-sepsia com PVPI degermante e tópico (PVPI 10%, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil), seguido da aposição de campos estéreis. Como complementação anestésica os animais receberam infiltração local de cloridrato de 0.3 ml/Kg mepivacaína (Scandicaine 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França). Os animais foram posicionados em decúbito dorsal em mesa de operação personalizada. A sindesmotomia da inserção gengival foi realizada cuidadosamente por meio de um descolador delicado (Descolador de Molt 9, Quinelato, São Paulo, Brasil) seguido da luxação e exodontia do dente. Após a exodontia foi realizado um descolamento dos tecidos moles da região que corresponde ao alvéolo do elemento extraído, com intuito de auxiliar na manutenção do coágulo e fechamento primário do alvéolo por tecido mole. Em seguida realizou-se a sutura com fio absorvível de Poliglactina 910 espessura 4.0 (Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil)). No pós-operatório os animais receberam administração IM de 15 mg/kg de cefalotina (Keflin® Neutro, Antibióticos do Brasil Ltda, Sumaré, Brasil) a cada 12h por 48 horas (Figura 2).

FIGURA 2 - Imagem representativa do procedimento experimental; A) Posição do animal em mesa de operação personalizada; B) Alvéolo recém operado; C) Primeiro molar inferior direito após a exodontia; D) Alvéolo preenchido por coágulo (GC) após a extração; E) Alvéolo preenchido por biomaterial (GB); F) Sutura após a exodontia



Abaixo segue o esquema de distribuição dos animais em grupos e períodos de acordo com as análises que foram realizados

FIGURA 3 - Esquema de distribuição dos animais nos grupos da análise



Fonte: Autor, 2020

3.5 Eutanásia

Passados 36 dias das exodontias de todos os animais pertencentes a metodologia de cortes calcificados, foram submetidos a eutanásia com dose excessiva de anestésico, tiopental sódico (150mg/kg) e lidocaína 2% (10 mg/kg). Foi realizada a ressecção em bloco da região alveolar dos molares para análise de microtomográfica.

3.6 Análise Microtomográfica (Micro-Ct)

Após a eutanásia dos animais, as maxilas dos animais dos 2 grupos experimentais foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) durante 24 horas, seguidos de banho em água corrente por 24 horas. Após a fixação, as peças foram armazenadas em álcool 70%, para a realização da análise microtomográfica. A análise microtomográfica será realizada de acordo com metodologia descrita por Bouxsein.³¹

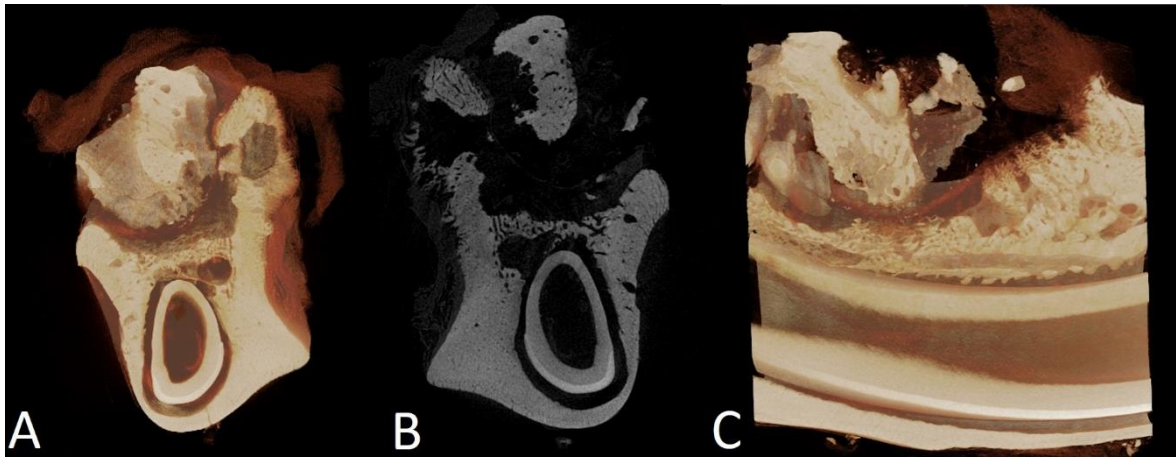
Por meio do microtomógrafo Skyscan (SkyScan 1272 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) as peças foram escaneadas utilizando cortes de 6µm de espessura (90Kv e 111µA) com filtro de Al. 0,5mm + Cu 0,038 e passo de rotação de 0.5mm, tamanho do pixel de 2016x1344 µm e com tempo de aquisição de 1h e 32min.

As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas, determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0), com smoothing de 1, correção dos anéis de artefato de 8, correção de Beam Hardening de 24% e a faixa de conversão de imagem variou de 0,0 – 0,14. No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit), as imagens foram reconstruídas e observadas em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 BrukerMicroCT Versão 1.12.4.0) foi avaliado e mensurado³² o volume ósseo (BV), porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), separação e número de trabéculas (TB.Sp e Tb.N), e depois realizou-se a reconstrução em 3D pelo software CTvox (SkyScan, Versão 2.7).

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos através da análise micro tomográfica possibilitaram observar que no grupo controle (GC) houve formação de sequestros ósseos após o procedimento de exodontia dos primeiros molares inferiores (figura 4b). Outro ponto a ser destacado é que houve um atraso no processo de reparo do alvéolo (Figura 4c).

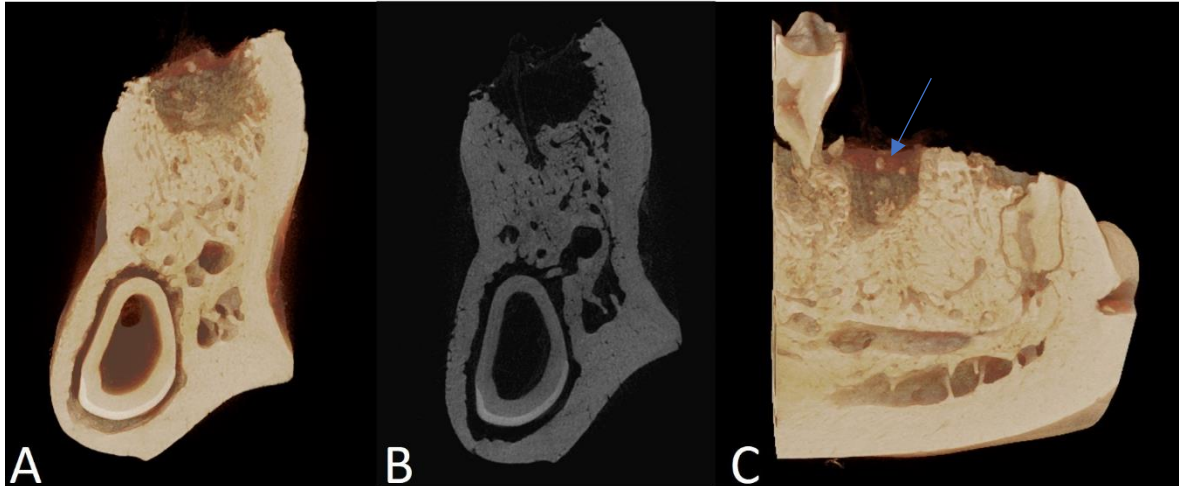
FIGURA 4 - Imagens obtidas através da análise micro-tomográfica do grupo GC (Micro-CT); A) Visão sagital no pós-operatório, evidenciando a presença de um sequestro ósseo; B) Corte parassagital, demonstrando alvéolo em fase de reparo com a presença de sequestro ósseo; C) Visão coronal da reconstrução 3D do alvéolo



Fonte: Autor, 2020

No grupo tratado com o biomaterial na forma de pasta a base de beta tricálcio fosfato (GB), a imagem obtida através da reconstrução dos cortes demonstra melhor reparo ósseo no interior do alvéolo (Figura 5a), sem presença de sequestros ósseos. Nota-se uma maior manutenção do volume alveolar e pode ainda ser observado algumas partículas do biomaterial no interior do alvéolo (Figura 5).

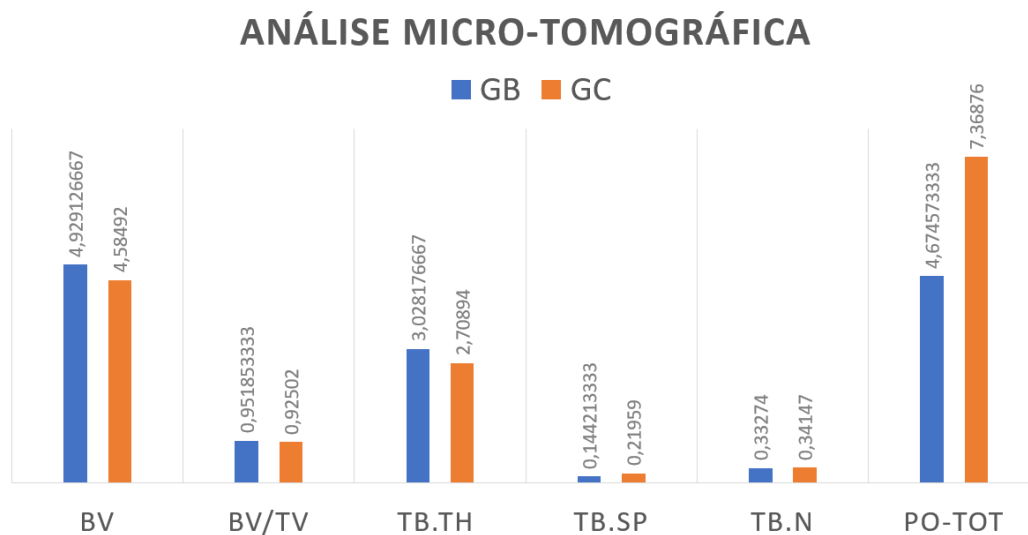
FIGURA 5 - Imagens obtidas através da análise micro-tomográfica do grupo GB (Micro-CT); A) Visão sagital no pós-operatório, evidenciado o processo de reparo e manutenção do volume alveolar; B) Corte parassagital da peça, demonstrando alvéolo em fase de reparo; C) Visão coronal da reconstrução 3D do alvéolo, onde nota-se reparo tecidual e resíduos do biomaterial no interior do alvéolo (seta)



Fonte: Autor, 2020

De acordo com trabalhos publicados a análise quantitativa foi realizada para obtenção dos dados abaixo. (Figura 6)

FIGURA 6 - Gráfico que expressa em valores quantitativos obtidos através da análise por microtomografia para mensuração do volume ósseo (BV), porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (TB.Th), separação de trabéculas (TB.SP) número de trabéculas (TB.N) e porosidade (PO.TOT)



Fonte: Autor, 2020

5 DISCUSSÃO

A OMIM foi descrita pela primeira vez em 2003 por Marx e col., em pacientes que faziam uso de bifosfonatos e foram submetidos a extração dentária. Após esse relato, vários novos casos de OMIM foram publicados.² Destaca-se o fato de que ainda não existe um protocolo aceito universalmente para o tratamento desta condição.^{1,2,7} Sendo assim evidencia a importância desse estudo que busca por novos protocolos que podem favorecer a prevenção da osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos (OMIM), aumentando o sucesso clínico do tratamento e diminuindo a morbidade.

As terapias para osteonecrose se baseiam, segundo a AAOMS, em eliminação da dor, controle de infecção e prevenção da progressão ou ocorrência de necrose óssea.¹⁴ Os tratamentos podem envolver desde a aplicação e uso de terapias com antibióticos a medidas cirúrgicas conservadoras, ou não.¹⁵ Como medida profilática, a antibioticoterapia é útil na tentativa de reduzir a osteonecrose em caso de pacientes que iram passar por algum trauma dental, seja ele extração dentária, implantes, entre outros.¹⁷ Após o aparecimento da doença, existem métodos que buscam inibir os danos sendo eles, conservadores ou não. Quando ocorre uma destruição óssea progressiva, os tratamentos conservadores parecem não apresentar o efeito desejado.^{20,21}

Pesquisas demonstram o efeito positivo de novas terapias no tratamento e prevenção da OMIM, como a PDT, que consiste na interação entre uma luz não térmica com um comprimento de onda específico e um fotossensibilizador que gera efeito bioestimulantes no osteoblastos e reduz a carga bacteriana.^{17,22,23,24,33,34} Desde então, pesquisas em modelo animal vêm sendo realizadas para demonstrar as repercussões do uso dos bifosfonatos no osso, que geram o aumento da densidade óssea e diminuem os espaços entre as trabéculas, causando diminuição dos canais nutritivos do tecido ósseo.³⁵

Nesse estudo o grupo GC, que recebeu ácido zoledrônico e posteriormente teve seu primeiro molar inferior direito extraído e preenchido por coágulo apresentou aumento da porosidade (PO-tot) e aumento do número de trabéculas (Tb.N), como podemos observar na figura 6, o que coincide com o estudo realizado por Rubira e col.³⁶ que observou, em casos que usaram ZOE, um aumento

de volume e densidade óssea, aumento de trabéculas e diminuição dos canais nutritivos.¹²

Em condições de normalidade, o reparo alveolar inicia-se logo após o ato cirúrgico e completa-se cerca de 64 dias após o ato cirúrgico no ser humano.³⁷ Acredita-se que o uso de agentes antirreabsortivos como o ácido zoledrônico acarrete em uma supressão excessiva dos osteoclastos e prejudique o turnover ósseo, ou seja, os traumas causados no tecido ósseo impedem que haja reparação tecidual e resultam em necrose óssea³⁸ como podemos observar na Figura 4.

Os achados da literatura e a busca por novas terapias instigaram os participantes desta pesquisa a propor o estudo com um biomaterial (β -tricálcio-fosfato) com a suposição de que esse material atuaria como um agente osteocondutor, auxiliando o processo de reparo alveolar. Os resultados do trabalho de Silva demonstraram que o uso do biomaterial a base de β -tricálcio-fosfato foi capaz de prevenir a OMIM no reparo alveolar em ratos tratados por ácido zoledrônico.³⁹

O β -TCP é um biomaterial sintético, biocompatível, bioativo possui boa absorção e é osteocondutor⁴⁰ ele é reabsorvido e substituído por osso novo, e dessa forma favorece a colonização do meio por células osteogênicas,⁴¹ e tem capacidade de reduzir a perda óssea após exodontia, modulando a remodelação óssea.⁴² Outros estudos demonstraram bons resultados na aplicação β -TCP como substituo ósseo.⁴³⁻⁴⁵ Quando se opta pela utilização de biomaterial a base de fosfato de cálcio por possuir papel fundamental na atividade de reabsorção por osteoclastos.

Como podemos observar (Figura 5) o uso do biomaterial a base de β -TCP favoreceu o processo de reparo ósseo, pois atuou como uma matriz tridimensional durante o processo de formação óssea, demonstrando seu potencial osteocondutor. Os biomateriais a base de fosfato de cálcio destacam-se por possuírem propriedades bioativas e propriedades químicas similares com a fase mineral do osso⁴⁶ dessa forma são muito utilizados para regeneração óssea.⁴⁷ É um fato que pode ser observado nos resultados deste estudo, tendo em vista, que o grupo tratado com o biomaterial mostra um maior reparo ósseo no interior do alvéolo e manutenção do volume desse alvéolo quando comparado ao grupo controle.

6 CONCLUSÃO

Pode concluir que o uso do biomaterial a base de β -TCP favoreceu a manutenção do volume alveolar em alvéolos de ratos pós-exodônticos tratados previamente com ácido zoledrônico.

REFERÊNCIAS

1. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw-2014 update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014;72:1938-56.
2. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003;61:1115-7.
3. Hagiwara M, Delea TE, Cong Z, Chung K. Utilization of intravenous bisphosphonates in patients with bone metastases secondary to breast, lung, or prostate cancer. *Support Care Cancer.* 2014;22:103-13.
4. Zhang J, Wang R, Zhao YL, Sun XH, Zhao HX, Tan L, et al. Efficacy of intravenous zoledronic acid in the prevention and treatment of osteoporosis: a meta-analysis. *Asian Pac J Trop Med.* 2012;5(9):743-8.
5. Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone.* 2011;49(1):2-19
6. Russell RG, Watts NB, Ebtino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int.* 2008;19(6):733-59.
7. Fung P, Bedogni G, Bedogni A, Petrie A, Porter S, Campisi G, et al. Time to onset of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a multicentre retrospective cohort study. *Oral Dis.* 2017;23(4):477-483.
8. Bamias A, Kastritis E, Bamia C, Moulopoulos LA, Melakopoulos I, Bozas G, et al. Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. *J Clin Oncol.* 2005;23(34):8580-7.
9. Liu L, Li C, Yang P, Zhu J, Gan D, Bu L, et al. Association between alendronate and atypical femur fractures: a meta-analysis. *Endocr Connect.* 2015;4(1):58-64.

10. Barba-Recreo P, Del Castillo Pardo de Vera JL, García-Arranz M, Yébenes L, Burgueño M. Zoledronic acid-related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. *J Craniomaxillofac Surg*. 2014;42(6):744-50.
11. 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.
12. Soares MQS, Van Dessel J, Jacobs R, Silva Santos PS, Cestari TM, Garlet GP, et al. Zoledronic acid induces site-specific structural changes and decreases vascular area in the alveolar bone. *J Oral Maxillofac Surg*. 2018;76(9):1893-901.
13. Williams DW, Lee C, Kim T, Yagita H, Wu H, Park S, et al. Impaired bone resorption and woven bone formation are associated with development of osteonecrosis of the jaw-like lesions by bisphosphonate and anti-receptor activator of NF- κ B ligand antibody in mice. *Am J Pathol*. 2014;184(11):3084-93.
14. 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.
15. Statkiewicz C, Toro LF, Mello-Neto JM, Sá DP, Casatti CA, Issa JPM, et al. Photomodulation multiple sessions as a promising preventive therapy for medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in rats. *J Photochem Photobiol B*. 2018;184:7-17.
16. Rupel K, Ottaviani G, Gobbo M, Contardo L, Tirelli G, Vescovi P, et al. A systematic review of therapeutical approaches in bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Oral Oncol*. 2014;50(11):1049-57.
17. Castro MS, Ribeiro NV Jr, Carli ML, Pereira AA, Sperandio FF, Hanemann JA. Photodynamically dealing with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: Successful case reports. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2016;16:72-5.

18. El-Rabbany M, Sgro A, Lam DK, Shah PS, Azarpazhooh A. Effectiveness of treatments for medication-related osteonecrosis of the jaw: a systematic review and meta-analysis. *J Am Dent Assoc.* 2017;148(8):584-94.e2.
19. Nisi M, Karapetsa D, Gennai S, Ramaglia L, Graziani F, Gabriele M. Conservative surgical treatment of medication related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) lesions in patients affected by osteoporosis exposed to oral bisphosphonates: 24 months follow-up. *J Craniomaxillofac Surg.* 2018;46(7):1153-8.
20. Stanton DC, Balasarian E. Outcome of surgical management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: review of 33 surgical cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(5):943-50.
21. Pichardo SE, Kuijpers SC, van Merkesteyn JP. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: Cohort study of surgical treatment results in seventy-four stage II/III patients. *J Craniomaxillofac Surg.* 2016;44(9):1216-20.
22. O'Riordan K, Akilov OE, Hasan T. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiag Photodyn Ther.* 2005;2(4):247-62.
23. Bisland SK, Burch S. Photodynamic therapy of diseased bone. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2006;3(3):147-55.
24. Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron.* 2016;22(3):7000417.
25. Noda M, Aoki A, Mizutani K, Lin T, Komaki M, Shibata S, Izumi Y. High-frequency pulsed low-level diode laser therapy accelerates wound healing of tooth extraction socket: An in vivo study. *Lasers Surg Med.* 2016;48(10):955-964.
26. Takeda Y. Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction. Experimental study in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1988;17(6):388-91.
27. Eroglu CN, Keskin Tunc S. Effectiveness of single session of low-level laser therapy with a 940 nm wavelength diode laser on pain, swelling, and trismus after impacted third molar surgery. *Photomed Laser Surg.* 2016;34(9):406-10.

28. Ferrante M, Petrini M, Trentini P, Perfetti G, Spoto G. Effect of low-level laser therapy after extraction of impacted lower third molars. *Lasers Med Sci.* 2013;28(3):845-9.
29. Yamada SI, Kurita H, Kondo E, Suzuki S, Nishimaki F, Yoshimura N, et al. Treatment outcomes and prognostic factors of medication-related osteonecrosis of the jaw: a case- and literature-based review. *Clin Oral Investig.* 2019;23(8):3203-11.
30. Curra C, Cardoso CL, Ferreira Júnior O, Curi MM, Matsumoto MA, Cavenago BC, et al . Medication-related osteonecrosis of the jaw. Introduction of a new modified experimental model. *Acta Cir Bras.* 2016;31(5):308-13.
31. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010;25(7):1468-86.
32. Glösel B, Kuchler U, Watzek G, Gruber R. Review of dental implant rat research models simulating osteoporosis or diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2010;25(3):516-24.
33. Bayram H, Kenar H, Taşar F, Hasırcı V. Effect of low level laser therapy and zoledronate on the viability and ALP activity of Saos-2 cells. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2013;42(1):140-6.
34. Hafner S, Ehrenfeld M, Storz E, Wieser A. Photodynamic inactivation of actinomyces naeslundii in comparison with chlorhexidine and Polyhexanide--A new approach for antiseptic treatment of medication-related osteonecrosis of the jaw? *J Oral Maxillofac Surg.* 2016;74(3):516-22.
35. Poubel VLDN, Silva CAB, Mezzomo LAM, De Luca Canto G, Rivero ERC. The risk of osteonecrosis on alveolar healing after tooth extraction and systemic administration of antiresorptive drugs in rodents: a systematic review. *J Craniomaxillofac Surg.* 2018;46(2):245-6.
36. Soares MQS, Dessel JV, Jacobs R, Santos PSS, PhD, Cestari TM, Gustavo Pompermaier Garlet, Rubira-Bullen IRF : Zoledronic Acid Induces Site-Specific

Structural Changes and Decreases Vascular Area in the Alveolar Bone American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons J Oral Maxillofac Surg -:1-8, 2018

37. Marzola C, Toledo Filho JL, Macari De Abreu E, Lopes Toledo G, Capelari MM, Pastori CM, et al.. Alveolar healing. Microscopically and clinical aspects. Rev Odontol. 2010;10:116-39.

38. Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. J Oral Maxillofac Surg. 2004;62(5):527-34.

39. Silva JRD. Prevenção da osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos com a utilização de enxerto xenógeno e β -trifosfato de cálcio (β -TCP) [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista; 2018.

40. Boyne PJ. Current developments with growth factors and bone proteins. Dent Implantol Update. 1999;10(4):25-7.

41. Daculsi G, Jegoux F, Layrolle P. The micro macroporous biphasic calciumphosphate concept for bone reconstruction and tissue engineering. In: Basu B, Katti,DS, Kumar A, editors. Advance biomaterials: fundamentals processingand applications. New York: Wiley-American Ceramic Society; 2009. p. 101–42.

42. Bodde EW, Wolke JG, Kowalski RS, Jansen JA. Bone regeneration of porous beta-tricalcium phosphate (conduict TCP) and biphasic claclium phosphate ceramic (Biosel) in trabecular defects in sheep. J Biomed Mater Res A. 2007;82(3)711-22.

43. Rouvillain JL, Lavallé F, Pascal-Mousselard H, Catonné Y, Daculsi G. Clinical, radiological and histological evaluation of biphasic calcium phosphate bioceramic wedges filling medial high tibial valgisation osteotomies. Knee. 2009;16(5):392-7.

44. Wang Y, Wang K, Li X, Wei Q, Chai W, Wang S, et al. 3D fabrication and characterization of phosphoric acid scaffold with a HA/ β -TCP weight ratio of 60:40 for bone tissue engineering applications. PLoS One. 2017;12(4):e0174870.

45. Escobar T, Almeida e Sousa J, Portela A, Vasconcelos M, Faria de Almeida R. The effect of a biphasic calcium phosphate on bone healing: a pilot study in rats. *Int J OralMaxillofac Implants*. 2014;29(6):1322-31.

46. Ebrahimi M, Botelho MG, Dorozhkin SV. Biphasic calcium phosphatesbioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;71:1293-312.

47. Thrivikraman G, Athirasala A, Twohig C, Boda SK, Bertassoni LE. Biomaterials for Craniofacial Bone Regeneration. *Dent Clin North Am*. 2017;61(4):835-56.

ANEXO A



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Tratamento da osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos com a utilização da terapia fotodinâmica. Estudo experimental in vivo", Processo FOA nº 00810-2018, sob responsabilidade de Francisley Ávila Souza apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 15 de Março de 2019.

VALIDADE DESTA CERTIFICADO: 02 de Janeiro de 2020.


DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 02 de Fevereiro de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Treatment of osteonecrosis of jaw induced by medicines with the use of photodynamic therapy. Experimental study in vivo", Protocol FOA nº 00810-2018, under the supervision of Francisley Ávila Souza presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on March 15, 2019.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: January 02, 2020.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: February 02, 2020.


Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Favorani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (18) 3636-3234 Email: CEUA@fca.unesp.br