NATALIA CAROLINE AGUIAR TARTAROTI

**Efeito de diferentes concentrações do Denosumab sobre a viabilidade,
proliferação e migração de fibroblastos em cultura**

São Paulo

2016

NATALIA CAROLINE AGUIAR TARTAROTI

**Efeito de diferentes concentrações do Denosumab sobre a viabilidade,
proliferação e migração de fibroblastos em cultura**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais

Orientador: Profa. Dra. Maria da Graça Naclério-Homem

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Tartaroti, Natalia Caroline Aguiar.

Efeito de diferentes concentrações do Denosumab sobre a viabilidade, proliferação e migração de fibroblastos em cultura / Natalia Caroline Aguiar Tartaroti; orientador Maria da Graça Naclério Homem. -- São Paulo, 2016.

81 p. : fig., graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Osteonecrose. 2. Maxilar. 3. Fibroblastos. 4. Mucosa oral. I. Naclério-Homem, Maria da Graça. II. Título.

Tartaroti NCA. Efeito de diferentes concentrações do Denosumab sobre a viabilidade, proliferação e migração de fibroblastos em cultura. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 08/12/2016

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Maria Stella Moreira

Instituição: UNIB

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Maria Cristina Zindel Deboni

Instituição: FOU SP

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Andréia Aparecida Traina

Instituição: FOU SP

Julgamento: Aprovada

Aos meus queridos pais, Angela e Schubert, por todo suporte, incentivo e carinho ao longo de toda minha vida. Você, pai, que sempre incentivou minha formação acadêmica e que praticamente tomou minhas conquistas como suas mostrando que o melhor caminho a se seguir é o do conhecimento. Você, mãe, sempre ensinando, através de suas ações, que uma mente inteligente deve sempre ter um coração vívido e acolhedor. Com suas características distintas tive muito o que aprender e hoje sigo tentando reproduzir as boas ações feitas ao longo de suas vidas.

Agradecimento será sempre o sentimento
que carregarei ao lembrar de vocês.

Ao meu marido, Rafael, que realmente me mostrou o que significa companheirismo. Apoiou-me durante todo o mestrado, engajou-se em conhecer o assunto que eu iria abordar para que pudéssemos discutir, ouviu minhas incontáveis histórias com as células sem nunca parecer entediado e acima de tudo mostrou amor incondicional todos os dias. Te agradeço por tudo, meu amor.

A minha irmã, Jaqueline, amiga e colega de profissão. Dividimos momentos, dividimos alegrias e dividimos materiais da faculdade. Nossos caminhos sempre foram semelhantes e assim espero que nosso sucesso profissional se dê da mesma forma.

Amo vocês

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Professora ***Dra. Maria da Graça Naclério-Homem***, é incrível ver quando a senhora acredita em uma pessoa não mede esforços para ajudar em tudo o que for possível. E é assim que me sinto, vejo o empenho da senhora em me ajudar desde o começo. Aliás esse começo se deu ainda no final do primeiro ano da graduação e após duas iniciações científicas tinha certeza de que havia feito a escolha certa de me agarrar aos seus passos e tentar reproduzi-los. Só posso agradecer todos esses anos de orientação, me espelho em suas atitudes e conquistas na vida profissional e o mínimo que aceito ser é tão capaz quanto a senhora e para isso espero muitos anos ainda de orientação. Obrigada por acreditar em mim e por me conduzir.

A Professora ***Dra. Márcia Martins Marques*** que em muito contribuiu para que esse projeto fosse possível, sempre entusiasta e interessada em resolver os problemas que para mim não haviam solução e apontando a resolução de maneira tão simples e óbvias. Obrigada por abrir as portas do laboratório ao qual chefiava e por ser um exemplo mais claro do que um professor deve ser: um estimulador de conhecimento. A terei sempre como modelo e nunca esquecerei de como a senhora vibra por seus alunos, desde de um aluno de iniciação em seus primeiros passos até os alunos de pós-graduação.

A Professora ***Dra. Maria Cristina Zindel Deboni*** obrigada por ser tão disponível a me ajudar em minhas dúvidas acadêmicas! Percebemos o seu empenho e envolvimento com o seu trabalho e isso se transfere a seus alunos. Você está sempre disposta e animada em todas as clínicas, tentando ao máximo ajudar os pacientes no que for necessário, características fundamentais para nós que lidamos com seres humanos. Me espelharei sempre na junção de competência e humanidade vistos em seus trabalhos.

A Professora ***Dra Mariana Aparecida Brozowski***. Mari, não tenho palavras para te agradecer por tudo o que você me ajudou. Desde a iniciação científica até a minha dissertação de mestrado vejo um cuidado que você não precisaria ter tido.

Agora quando estou no laboratório me recordo de todos os ensinamentos e momentos bons que passamos, mesmo aos finais de semana para cuidar das células! Desejo um caminho repleto de luz e realizações, você é um exemplo de dedicação e determinação. Sei que seus alunos terão muita sorte de tê-la como professora.

A **Dra. Vera Pozzani**, sempre disposta e solícita, muito obrigada por sempre me auxiliar nos casos de nossas pacientes de osteonecrose e por buscar novos meios de resolver ou amenizar os desconfortos dos pacientes.

Aos **meus familiares** que de forma direta ou indireta contribuíram para a minha realização profissional. Com certeza sem o apoio e amor incondicional de vocês eu não conseguiria ser tão feliz.

As **minhas amigas da turma 107**, começamos a trilhar o nosso caminho juntas e ao final da faculdade sabíamos que o prazer de dividir todas as manhas e tardes não seriam mais o nosso privilégio. Entretanto soubemos conciliar a vida profissional com nossa amizade e hoje tenho o prazer de dizer que vocês são irmãs-amigas Obrigada por todo apoio, sei que vocês torcem por mim e espero que cada uma tenha um futuro brilhante.

Aos amigos da pós-graduação, **Natacha Kalline, Milton Saavedra, Ricardo D'avila, Vitor Rodrigues, Yuri Slusarenko, Alex de Freitas, Daniel Sendik e Ana Paula Barbosa** por todos momentos bons compartilhados juntos.

As minhas novas colegas do laboratório de cultivo celular, **Ana Clara Pedroni e Gabriela Abe** por toda ajuda prestada durante o meu cultivo celular resolvendo minhas inúmeras dúvidas e sendo tão prestativas. Desejo muito sucesso na jornada de vocês!

A funcionária da disciplina de cirurgia **Aparecida Conceição de Sousa** obrigada por sempre nos ajudar no que fosse necessário! Espero que com sua aposentadoria você trilhe novos e brilhantes caminhos.

Aos secretários do departamento **Edison Henrique Vicente e Roseli de Andrade** por sempre me ajudar e orientar quanto a infinidade de papeis que deveríamos assinar e relatórios a entregar!

A **Débora de Oliveira Franca** funcionária do laboratório de cultivo celular, obrigada pela ajuda no laboratório.

A **Priscila Ribeiro** aluna de iniciação científica na qual tive o prazer de ajudar orientando no que fosse possível para que seu trabalho fosse realizado. Muito obrigada pela ajuda no laboratório com o cultivo celular, nossos finais de semana no laboratório surgiram efeito!

Aos **alunos de graduação** que permitiram sentir um pouco da responsabilidade de ser um professor e também de como isso pode se tornar gratificante.

A senhora **Maria Matiko** paciente com osteonecrose que por muitos anos colocou sua confiança em nosso tratamento. Sempre com um sorriso no rosto e provando que as intempéries da vida não podem nos abalar quando enfrentamos tudo de maneira positiva.

A **Faculdade de Odontologia** e a **Universidade de São Paulo**, por fornecerem infraestrutura para realização da pós-graduação e a todos os seus funcionários.

Ao **Serviço de Biblioteca**, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo pela revisão deste trabalho.

A **CAPES** – Coordenação de aprimoramento Pessoal em Nível Superior pela bolsa de mestrado concedida.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar esse trabalho; muito obrigada.

RESUMO

Tartaroti NCA. Efeito de diferentes concentrações do Denosumab sobre a viabilidade, proliferação e migração de fibroblastos em cultura. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Corrigida.

Atualmente é crescente o número de pacientes utilizando drogas que visam a alteração da remodelação óssea. Doenças como osteoporose e tumores ósseos têm possibilidade de tratamento com a utilização dos antirreabsortivos. Entretanto tais medicamentos apresentam, entre outros, um efeito colateral muito nocivo: a osteonecrose dos maxilares (ONM), que consiste em uma lesão rara, mas grave, da mandíbula ou maxila caracterizada por necrose óssea exposta. O denosumab é uma droga antirreabsortiva que possui um mecanismo de ação diferente do encontrado nos bisfosfonatos (BFs), medicação amplamente usada e anterior ao denosumab, entretanto já mostra efeitos colaterais similares aos BFs em relação à ONM e para ambos os medicamentos a fisiopatogenia da doença ainda não está esclarecida pela literatura. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações do denosumab sobre a viabilidade, proliferação e migração de fibroblastos em cultura. Foram utilizados fibroblastos de mucosa bucal humana linhagem FMM1. Após serem submetidos aos testes de citotoxicidade com concentrações do denosumab variando de $10^{-3} \mu\text{g}$ a $10^{-7} \mu\text{g}$ os fibroblastos não apresentaram quaisquer alterações quanto aos quesitos avaliados. Foi possível concluir que o denosumab não é citotóxico para fibroblastos em cultura.

Palavras-chaves: Denosumab. Osteonecrose dos maxilares Fibroblastos

ABSTRACT

Tartaroti NCA. Effect of different concentrations of denosumab on the viability, proliferation and migration of fibroblasts in culture. [dissertation] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Corrigida.

The number of patients using drugs that target the manipulation of bone remodeling is currently increasing. Bone volume diseases such as osteoporosis and tumors have the possibility of treatment with the use of antiresorptive medications. However, these drugs, among others, may present a very harmful side effect: osteonecrosis of the jaw (ONJ), which consists of a rare but severe injury characterized by exposed bone necrosis. The denosumab is an antiresorptive drug that presents a different mechanism of action found in bisphosphonates (BPs) and shows similar side effects to BPs regarding ONJ. BPs are a class of medication widely used and prior to denosumab. In both drugs the pathophysiology of the disease it is still not clear. This study aimed to evaluate the effect of denosumab in different concentrations on the viability, proliferation and migration of fibroblasts in culture. Were used human oral mucosa fibroblasts FMM1. After being subjected to denosumab concentrations ranging from $10^{-3}\mu\text{g}$ to $10^{-7}\mu\text{g}$ fibroblasts did not show any changes to the variables evaluated. It was possible to concluded that denosumab is not cytotoxic to fibroblasts in culture.

Keywords: Denosumab. Osteonecrosis of the jaws. Fibroblast

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - Órgãos alvo da via RANK/ RANKL/ OPG	23
Figura 2.2 - Mecanismos de ação dos bisfosfonatos e do denosumab.....	33
Figura 4.1 - Fotomicrografia de células em subconfluência – linhagem FMM1	48
Figura 4.2 - Esquema de plaqueamento em placa de 96 poços demonstrando a distribuição dos grupos experimentais	50
Figura 4.3 - (A) Método Scratch fazendo a ferida com a ponta da pipeta p200. (B) Fotomicrografia de fase do campo de visão da ferida no tempo zero (C) fotomicrografia de fase do campo de visão da ferida após migração de células para área definida no tempo 12 horas	53
Gráfico 5.1 - Viabilidade celular: média da linhagem FMM1 em resposta a diferentes concentrações e denosumab	55
Gráfico 5.2 - Barra de crescimento celular da linhagem FMM1 submetidos a diferentes concentrações de denosumab	56
Figura 5.1 - Migração celular	55
Gráfico 5.3 - Representação gráfica dos índices de migração celular (número de células /área da ferida	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	TECIDO ÓSSEO	21
2.2	OSTEOPOROSE	25
2.3	ANTIRREABSORTIVOS	27
2.3.1	<i>Bisfosfonatos</i>	28
2.3.2	<i>Modeladores seletivos dos receptores de estrogênio</i>	29
2.3.3	<i>Calcitonina</i>	30
2.4	DENOSUMAB	30
2.4.1	<i>Características</i>	30
2.4.2	<i>Mecanismos de ação</i>	32
2.4.3	<i>Denosumab versus bisfosfonatos</i>	32
2.4.4	<i>Efeitos adversos</i>	36
2.5	OSTEONECROSE DOS MAXILARES RELACIONADOS A ANTIRREABSORTIVOS (MRONJ)	36
2.5.1	<i>Diagnóstico</i>	37
2.5.2	<i>Fisiopatologia da MRONJ</i>	38
2.5.3	<i>Fatores de risco</i>	39
2.5.4	<i>Prevenção e Tratamento</i>	40
3	PROPOSIÇÃO	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1	LINHAGEM CELULAR	47
4.2	CULTIVO CELULAR	47
4.3	SUBSTÂNCIA TESTADA	49
4.4	GRUPO EXPERIMENTAL	49
4.5	EXPERIMENTO	49
4.5.1	<i>Viabilidade celular</i>	50
4.5.2	<i>Proliferação celular</i>	51
4.5.3	<i>Migração celular</i>	52
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5	RESULTADOS	55
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXOS	80

1 INTRODUÇÃO

Desde a introdução dos bisfosfonatos (BFs) no tratamento de doenças que afetam a remodelação óssea, encontramos relatados aumento do número de casos de osteonecrose relacionadas aos maxilares (ONM) (1). O primeiro relato na literatura se deu em 2003 em pacientes com câncer, submetidos a tratamentos com altas doses de BFs intravenosos (2). É uma doença crônica debilitante que pode afetar a qualidade de vida de forma significativa e alguns pacientes podem não responder ao tratamento conservador ou cirúrgico, levando à propagação da infecção e destruição óssea progressiva (3). Estudos apontam que o tempo médio para o desenvolvimento da ONM em pacientes com câncer tratados com BFs via endovenosa é de 1,8 anos podendo variar de 6 a 60 meses (4) havendo relação entre a duração da terapia medicamentosa e a prevalência da doença (5). A ONM se inicia geralmente após extrações dentárias e existem também relatos que próteses mal adaptadas podem provocar úlceras de pressão levando ao aparecimento da lesão (6).

Vários mecanismos para explicar a correlação do uso desses medicamentos e a ONM têm sido propostos. A ONM está associada com a inibição da remodelação óssea, especialmente da atividade dos osteoclastos e, portanto, a osteonecrose pode ocorrer com todas as terapias de inibição de osteoclastos (7).

A ativação de osteoclastos é fundamental para os processos de remodelação óssea, envolvendo a reabsorção de tecido ósseo, pelos osteoclastos, formação e mineralização de matriz óssea, pelos osteoblastos. Em doenças como osteoporose, metástases tumorais osteolíticas, artrite reumatoide e doença periodontal há um desequilíbrio entre a formação e remoção óssea gerando perda de tecido ósseo aumentando a fragilidade esquelética e risco de fraturas (8).

Atualmente outros inibidores da diferenciação e função dos osteoclastos fazem parte do arsenal farmacológico para o tratamento de doenças do metabolismo ósseo. A identificação da via RANK/RANKL, na década de 1990, abriu portas para a possibilidade de se desenvolver novos medicamentos que combateriam a reabsorção óssea (9). O Denosumab é um agente antirreabsortivo ósseo que recebeu a aprovação pela Food and Drug Administration para uso em pacientes com

osteoporose e câncer metastático para os ossos. Porém o denosumab também tem sido associado com a osteonecrose dos maxilares.

As cirurgias dentoalveolares e doenças dentárias representam fatores de risco relacionadas com o uso de antirreabsortivos e a ONM e a maioria de ONM relacionadas com denosumab também tem sido associada a fatores de risco conhecidos incluindo extrações dentárias, má higiene bucal e próteses dentarias mal adaptadas (10). Em consequência, pode-se supor que se o paciente é submetido a um exame bucal correto preventivo antes do início da terapia com denosumab e procedimentos dentários invasivos durante e após a ingestão do medicamento forem evitadas, a prevalência de ONM em pessoas que recebem essa terapia pode ser reduzida.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é composto por áreas corticais e trabeculares formadas, principalmente, pela parte inorgânica (cristais de hidroxiapatita – 65%) e pela parte orgânica (35%). O componente inorgânico confere força e rigidez, já o componente orgânico inclui as células ósseas como as osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e proteínas da matriz como colágeno tipo 1, osteocalcina, osteonectina, osteopontina, sialoproteínas ósseas e proteoglicanas. Possui como principais funções suporte, invólucro para os tecidos do sistema hematopoiético ou do sistema nervoso central, servindo como um reservatório para o cálcio, fosfato e magnésio. Na fase de desenvolvimento suas atividades são voltadas para o crescimento e modelação óssea. Já na fase adulta a atividade metabólica envolve, principalmente, a remodelação que se baseia, basicamente, em dois princípios: a remoção localizada do osso antigo e substituição por osso formado (11-14).

Este processo é, essencialmente, realizado por células especializadas: osteoblastos e osteoclastos. Os osteoblastos são células sintetizadoras de matriz, derivadas de células do estroma ósseo que revestem qualquer superfície periosteal, endosteal ou trabecular onde a formação do osso esteja ocorrendo e se diferenciam em osteócitos quando ficam aprisionados na matriz óssea que eles mesmos sintetizaram. Já os osteoclastos são células gigantes e multinucleadas, altamente móveis e especializadas, derivadas da linhagem hematopoiética dos monócitos/macrófagos que secretam enzimas ácidas e líticas que degradam a matriz óssea (9, 15, 16). Em equilíbrio, numa ação conjunta para formar e reabsorver osso, essas células mantêm a manutenção da densidade óssea durante a vida adulta (17, 18).

A remodelação inicia-se pelo recrutamento de células precursoras de osteoclastos para o osso que ao receberem sinais físicos e hormonais concentram-se sobre a superfície óssea que será reabsorvida fundindo-se e transformando-se em osteoclastos multinucleados (17). A adesão dos osteoclastos à superfície do osso envolve a interação de integrinas da matriz extracelular à proteínas na matriz do osso(19) que ao se aderirem firmemente a essa superfície formam uma zona de selamento secretando enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases,

calagenases e gelatinases, que irão dissolver a matriz mineral e digerir os componentes orgânicos do osso (3, 5).

A regulação da formação óssea sofre influência de fatores autócrinos e parácrinos secretados pelas células, além de fatores da matriz óssea liberados durante a reabsorção. Hormônios circulantes, tais como hormônio da paratireóide (PTH), esteróides sexuais, a calcitonina e a vitamina D exercem influências sobre a remodelação óssea, mas a regulação fundamental é fornecida por muitas citocinas e fatores de crescimento que são produzidas por células ósseas e células do sistema imunológico (20-22).

Os osteoblastos desempenham um papel fundamental na reabsorção óssea e no controle hormonal da formação e diferenciação dos osteoclastos e sobre a função dos osteoclastos maduros uma vez que sintetizam os principais mediadores químicos envolvidos nesse processo: RANK-L, M-CSF e OPG que são reguladores chave na remodelação do osso. RANK, RANKL, e OPG são membros da família de proteínas de fator de necrose tumoral (23-28).

O M-CSF, também chamado de fator estimulador de colônia de macrófagos, é um polipeptídeo de ação local que estimula a diferenciação de células precursoras da medula em macrófagos sendo sintetizado por macrófagos, células endoteliais, osteoblastos e fibroblastos. As moléculas de M-CSF se ligam aos seus receptores, presentes nas células precursoras de osteoclastos, promovendo a sinalização necessária à sobrevivência e proliferação destas células. Apenas a expressão de M-CSF em si não é suficiente para estimular a diferenciação das células progenitoras em osteoclastos maduros, a completa diferenciação dos osteoclastos requer a expressão de RANKL pelas células osteoblásticas e de RANK pelos percussores osteoclásticos (9, 23, 29).

RANKL, também denominado ligante da osteoprotegerina (OPGL), é uma proteína transmembrana importante para osteoclastogênese, composta por 317 aminoácidos, é expressada principalmente em osteoblastos, entretanto também pode ser encontrada em células dendríticas, ligamento periodontal, células B, algumas células tumorais, odontoblastos, cementoblastos, ameloblastos e linfócitos ativos (29, 30).

Ele é o principal regulador da reabsorção óssea (31) e tem como papel primordial, quando na presença de baixas concentrações de M-CSF, a estimulação da fusão, da diferenciação, da ativação e da inibição da apoptose dos osteoclastos

ao se ligar ao RANK na superfície dos pré-osteoclastos resultando no aumento de osteoclastos ativos e em reabsorção óssea (32, 33). Além disso tem efeito sobre as células do sistema imune, promove a inibição de apoptose de células dendríticas, indução de formação de cachos de células dendríticas e efeito sobre a proliferação de células T (23, 25, 30, 34).

O RANKL ativa seu receptor específico RANK e assim sinaliza uma cascata de sinais que estão relacionados com a proliferação, diferenciação e apoptose celular. A resposta celular do RANKL depende da presença do receptor inibitório, a osteoprognerina (OPG) e também do nível de expressão do seu receptor RANK (9, 32).

A expressão de RANKL também foi detectada em uma ampla variedade de tecidos incluindo baço, placenta, coração, estômago, glândula da tiróide, pulmão, cérebro, timo, nódulos linfáticos (Figura 2.1) (35).

Figura 2.1 – Órgãos alvo da via RANK/ RANKL/ OPG

Fonte: Traduzido de Sinninger (2012)

O RANK é um receptor transmembrana, um peptídeo de 616 aminoácidos, expresso em células de linhagem macrófaga/ monocítica, precursores osteoclásticos e osteoclastos maduros, células T e B e células dendríticas. Seu principal papel é a estimulação da diferenciação e ativação das células precursoras de osteoclastos promovendo sua maturação e a inibição da apoptose dos osteoclastos (13).

A cascata de sinalização do RANK é complexa e pouco compreendida e seu papel na osteoclastogênese e na proliferação de células tumorais está sendo investigado. A expressão da proteína RANK tem sido encontrada na glândula mamária e em algumas células cancerosas, incluindo câncer de mama e próstata, dois tipos de tumores com elevado potencial de metástase óssea (25).

A OPG, uma glicoproteína de 380 aminoácidos, é um receptor solúvel que atua como antagonista do RANKL. É expressada por numerosos tipos celulares como osteoblastos, cementoblastos, e linfócitos T. Ela possui estrutura similar ao RANK, presente nas membranas dos osteoclastos. No entanto, não está vinculada à membrana celular pois é secretada pelos osteoblastos como um receptor autócrino para a molécula RANKL. Atua inibindo a diferenciação dos precursores da medula óssea de maneira irreversível, a sobrevivência e fusão osteoclástica, assim como estimula a apoptose de osteoclastos maduros pois evita a ligação de RANKL ao seu receptor RANK, ligando-se a si mesma ao RANKL, resultando assim, numa diminuição da reabsorção óssea. A maioria dos fatores que induzem a expressão de RANK-L por osteoblastos também regula a expressão de OPG (25, 28-30, 32).

Isto demonstra que a presença da OPG é essencial para a manutenção da massa óssea em situações fisiológicas funcionando como um poderoso agente osteoprotetivo (36), ou seja, as moléculas de RANK-L estimulam a reabsorção óssea, enquanto as de OPG inibem este processo. Quando há um desequilíbrio neste mecanismo, pode ocorrer uma maior reabsorção ou uma maior formação de tecido ósseo (37, 38).

A descoberta do sistema RANKL / RANK / OPG tem sido um dos mais importantes avanços no estudo do metabolismo ósseo nas últimas décadas (25, 29). São considerados como mediadores chave na osteoclastogênese e na reabsorção óssea e provavelmente contribuem para a patogênese subjacente de metástases de células tumorais ao osso sendo detectados em vários tumores, tais como câncer de mama, câncer de próstata e tumores ósseos malignos. As células tumorais podem

atuar diretamente mudando a ativação dos osteoclastos por meio da produção de RANKL e/ou OPG ou com a produção de outros fatores que, indiretamente, estimulam os osteoblastos para produzir RANKL ou OPG (33, 35, 39).

2.2 OSTEOPOROSE

A maioria das doenças ósseas é causada por um distúrbio no número e atividade das células osteoclásticas, resultando em uma perda óssea que excede a capacidade compensatória dos osteoblastos. O aumento dessa atividade é visto em numerosas desordens osteopênicas como a osteoporose pós menopausa, doença de Paget, metástases ósseas e artrite reumatoide (37, 40). Assim o conhecimento sobre os múltiplos mecanismos ósseos regulatórios deve auxiliar o entendimento sobre a remodelação óssea e oferecer explicações para as alterações que ocorrem nessas enfermidades (13, 41).

Projeções feitas estimam que 200 milhões de pessoas em todo o mundo serão atingidos pela osteoporose, não só pelo aumento do número de idosos, mas também pelo aumento da expectativa de vida. No Brasil, 70 mil pessoas fraturam o colo do fêmur a cada ano sendo que 20% morrem de complicações nos primeiros seis meses do pós-operatório e metade nunca mais terá uma vida independente (3).

A osteoporose é o tipo mais comum de doença metabólica do osso e se caracteriza por um aumento da porosidade do esqueleto resultando numa redução da massa óssea. Como resultado, a resistência do osso está reduzida e o risco de fratura se eleva. Geralmente, apresenta-se assintomática e, na maioria dos pacientes, é diagnosticada após uma fratura (21, 34, 41-44).

A Organização Mundial da Saúde utiliza o termo osteopenia para uma densidade mineral óssea entre 1 a 2,5 desvios padrões abaixo do pico de massa óssea e o termo osteoporose para uma densidade com mais de 2,5 desvios padrões abaixo do pico de massa. O diagnóstico da osteoporose pode ser feito por meio da mensuração da densidade mineral óssea (DMO) (45).

As formas mais comuns de osteoporose são a senil e a pós-menopausal. A osteoporose resultante do envelhecimento normal, que ocorre tanto em homens

quanto em mulheres, está associada a uma diminuição mais equilibrada da massa óssea cortical e trabecular. Dois fatores importantes podem estar associados na sua patogênese: a diminuição na formação do osso pelos osteoblastos e um defeito primário na capacidade de os rins formarem 1,25-diidroxivitamina D juntamente com a diminuição da sensibilidade do intestino a essa vitamina, diminuindo a absorção de cálcio (45).

Já a osteoporose pós-menopausal pode levar a uma perda do osso trabecular mais rápida que a do osso cortical nos primeiros 5 a 10 anos da menopausa afetando, principalmente, os ossos ou porções de ossos que possuem maior área de superfície. As trabéculas ósseas perdem suas interconexões e ficam mais finas, levando a micro fraturas progressivas. O estrogênio desempenha um papel importante nesse fenômeno visto que a queda de suas taxas está relacionada à ocorrência de osteoporose (21). A deficiência estrogênica promove perda de massa óssea em decorrência do desequilíbrio da remodelação óssea, o qual determina maior reabsorção em relação à neoformação óssea (46).

O estrogênio atua sobre os monócitos promovendo a redução dos níveis de IL-1 e TNF- α e estes, por sua vez, estimulam a produção de outras citocinas como o IL-6, M-CSF e GM-CSF que promovem a fusão de células precursoras de osteoclastos. Assim, o estrogênio age inibindo a formação de osteoclastos (21, 47, 48). Existe, ainda, outro mecanismo no qual o estrogênio inibe a reabsorção óssea atuando sobre a via RANK/RANKL/OPG. Ao agir sobre células mesenquimais osteoprogenitoras e osteoblastos, o estrogênio promove a redução dos níveis de RANKL e o aumento da produção de OPG. Dessa forma a OPG, que se encontra em níveis aumentados, irá se ligar ao RANKL impedindo sua interação com o RANK que, conseqüentemente, inibirá a fusão dos precursores de osteoclastos (21).

Atualmente, muitas terapias estão disponíveis para o tratamento da osteoporose, entretanto algumas podem apresentar problemas relacionadas a eficácia e segurança de seu uso a longo prazo. Os agentes farmacológicos utilizados visam restaurar a força do osso e evitar fraturas. Eles atuam de duas maneiras: pela terapia antirreabsortiva, quando diminuem a taxa de reabsorção óssea e, assim, retardam a perda óssea, e pela terapia anabólica, quando promovem a formação óssea (49).

A combinação de cálcio e vitamina D é o tratamento básico para osteoporose já o uso da terapia de reposição hormonal é controverso pois pode apresentar efeitos adversos incluindo problemas vasculares e câncer de mama (50). Outro tratamento proposto é o uso de antirreabsortivos, como os bisfosfonatos e denosumab, tais agentes podem diminuir o risco de fratura, entretanto podem apresentar um efeito colateral raro porém debilitante: a osteonecrose dos maxilares (42).

2.3 ANTIRREABSORTIVOS

Antirreabsortivos são fármacos que suprimem a reabsorção óssea pela sua ação nos osteoclastos. São utilizados para o tratamento da osteoporose, osteopenia, câncer metastático dos ossos e outras doenças nas quais haja elevada reabsorção óssea. Tais medicamentos não conseguem promover ganhos na densidade mineral óssea (DMO) expressivo e tendem a diminuir a formação de novo osso pois a homeostase desse tecido e a DMO são asseguradas pelo equilíbrio entre a reabsorção e formação de osso durante o processo de remodelação. Qualquer agente que afete um braço do processo de remodelação geralmente também alterará o outro braço (20, 49).

Para inibir a remodelação, os agentes antirreabsortivos devem ou impedir a osteoclastogênese ou acessar os locais no qual haja osteoclastos maduros ativos reduzindo sua atividade ou sua longevidade. A eficácia dessa medicação também está relacionada ao local de sua deposição pois ossos trabeculares possuem partes mais finas e em contato próximo com espaços vasculares, apresentando grande superfície de contato. Inibir a remodelação intracortical pode ser mais difícil pois apresenta menor área de superfície. Sabe-se que os antirreabsortivos apenas diminuem a taxa de remodelação óssea o que, conseqüentemente, diminui o agravamento da porosidade óssea. Todavia reduzem o risco de fraturas (51).

São eles os bisfosfonatos, estrogênio ou modulador seletivo do receptor de estrogênio (MSRE) como o raloxifeno, denosumab e em menor grau a calcitonina. Esses fármacos inibem a perda do osso mediada por osteoclastos, reduzindo, assim, a renovação óssea.

2.3.1 Bisfosfonatos

Os bisfosfonatos (BFs) são um dos medicamentos mais prescritos para a osteoporose no mundo. Foram aprovados pelo FDA (Food and Drugs Administration) em 1991 para a comercialização, porém existem relatos sobre o seu uso desde 1968. Sua prescrição é indicada para o tratamento de metástases ósseas, câncer de pulmão, mieloma múltiplo, doença de Paget, controle de doenças do metabolismo do cálcio e nas últimas décadas seu uso foi intensificado para tratar e prevenir osteoporose e osteopenia (52-54).

Sua ação se dá basicamente pela sua capacidade de se ligar fortemente ao tecido ósseo, agir de forma inibitória sobre osteoclastos maduros e inibir a calcificação. Assim, o seu principal efeito é a inibição da reabsorção óssea (9, 52, 53).

Todos os bisfosfonatos atuam de maneira semelhante ao se ligarem aos cristais de hidroxiapatita, de forma permanente, sendo liberados da matriz óssea mediante a ação dos osteoclastos ativos que liberam enzimas e ácidos para a degradação do tecido mineral. Entre todos os bisfosfonatos, o ácido zoledrônico tem a maior afinidade de ligação à matriz mineral óssea, seguido por ordem decrescente: pamidronato, alendronato, ibandronato, risedronato, etidronato e clodronato. Os bisfosfonatos que tem maior afinidade, ligam-se com avidéz à superfície óssea e difundem-se lentamente pelo osso, enquanto agentes com menor afinidade, distribuem-se mais amplamente pelo osso, mas tem menor tempo de permanência nos tecidos quando o tratamento é suspenso (9, 42, 55, 56). Aproximadamente metade da dose recebida é excretada pela urina e o restante liga-se exclusivamente ao osso com uma meia vida de 10 anos ou mais, e o seu uso prolongado resulta em um acúmulo no esqueleto (49, 57).

Quatro mecanismos podem estar envolvidos na atuação dos BFs sobre os osteoclastos. São eles: a inibição do recrutamento de osteoclastos, a inibição da adesão ao tecido ósseo, o encurtamento do tempo de vida dos osteoclastos e a inibição de sua atividade. Tais efeitos podem ser devidos tanto a uma ação direta sobre os osteoclastos e seus precursores ou indiretamente por meio da ação sobre as células que modulam os osteoclastos (52). Uma vez absorvido pelo osteoclastos, os bisfosfonatos inibem a reabsorção óssea pelos efeitos intracelulares. Há 2 grupos

de bisfosfonatos, dependendo do seu mecanismo de ação: o grupo que não contém compostos nitrogenados, etidronato, clodronato e tiludronato, que se agrupam formando um análogo do ATP que inibem a enzima ATPdependente e o grupo que possuem compostos nitrogenados, alendronato, ibandronato, risedronato e ácido zoledrônico, que inibem a síntese de farnesil-pirofosfato (FPP), uma enzima que atua na função e sobrevivência dos osteoclastos e sua ausência leva à ruptura do citoesqueleto, à perda de orientação de osteoclastos, e ao desprendimento dos osteoclastos ao osso (9, 54, 58).

Os bisfosfonatos conseguem inibir a formação e a agregação de cristais de fosfato de cálcio bloqueando, assim, sua posterior transformação em hidroxiapatita (52). Seus efeitos físico-químicos são muito semelhantes aos do pirofosfato (9, 49), um metabólito natural do ser humano amplamente distribuído e que possui grande afinidade pelo tecido ósseo. Em células, o pirofosfato é rapidamente hidrolisado para fosfatos e utilizado para a função celular, no entanto, os bisfosfonatos internalizados pelos osteoclastos são resistentes à hidrólise, inibindo assim a ativação de enzimas que utilizam pirofosfato nos osteoclastos (49). Além disso o pirofosfato também é usado como um composto na indústria em cremes dentais para inibição da formação de cálculo por meio do bloqueio da precipitação do cálcio. Dessa maneira a administração tópica de bisfosfonatos pode levar a uma diminuição da formação de tártaro dentário (59).

Apresenta como efeitos adversos relatados nefrotoxicidade, sintomas de gripe aguda, irritação gastroesofágica e osteonecrose dos maxilares (ONM) (30, 49).

2.3.2 Modeladores seletivos dos receptores de estrogênio (MSRE)

O raloxifeno é um modulador seletivo do receptor de estrogênio que tem efeitos benéficos sobre o osso e lipídeos e que proporciona os benefícios da terapia com estrogênio ao esqueleto sem efeitos colaterais como o risco aumentado de câncer de mama, por exemplo. O tratamento resulta em um aumento na densidade mineral óssea, redução dos marcadores de remodelação e redução do risco de fraturas vertebrais (60, 61).

2.3.3 Calcitonina

A calcitonina também é um antirreabsortivo que foi aprovada nos EUA em 1995 na forma de spray nasal, para o tratamento de osteoporose no pós-menopausa. Ela diminui as concentrações plasmáticas de cálcio e fosfato em pacientes com hipercalcemia e isso resulta na diminuição da reabsorção óssea. A calcitonina age como a forma endógena do hormônio no receptor de calcitonina nos osteoclastos para diminuir sua atividade (42). Estudos mostraram a capacidade que ela tem em preservar a massa óssea trabecular entre pacientes com osteoporose (62, 63).

Deve-se notar que antirreabsortivos menos potentes, tais como a calcitonina e estrogênio, não têm sido relatados em associação à osteonecrose dos maxilares, por conseguinte, o nível de inibição de reabsorção provavelmente afeta o desenvolvimento da doença (49).

2.4 DENOSUMAB

2.4.1 Características

A OPG tem um efeito antirreabsortivo potente em mulheres no pós-menopausa e seu uso em pacientes foi testado. Entretanto a OPG recombinante criada possuía uma metabolização muito rápida e com isso administrações frequentes da droga eram necessárias para manter uma adequada supressão do *turnover* ósseo. Com isso novas buscas se iniciaram para produzir um inibidor de RANKL com uma meia-vida suficiente que permitiria uma dose e aplicação mais convenientes (64, 65). Assim foi desenvolvido o denosumab, que também é considerado um antirreabsortivo. Ele é um anticorpo monoclonal humano (IgG2), com meia-vida de 25 a 38 dias (66), que apresenta grande afinidade e especificidade para o RANKL e impede que esse ligante ative o seu receptor RANK na superfície de osteoclastos maduros e seus precursores agindo assim na formação, função e sobrevivência dos osteoclastos (38, 65, 67, 68).

Esse medicamento recebeu autorização de comercialização pela comissão europeia em maio de 2010 e aprovação pelo FDA em junho de 2010 (64, 69, 70). Apresenta-se comercialmente em injeções subcutâneas na versão de 60mg (Prolia) e 120mg (Xgeva). O Prolia é utilizado uma vez a cada seis meses e é indicado para o tratamento de mulheres na fase de pós-menopausa, osteoporose em homens e mulheres e tratamento de perda óssea relacionada ao câncer de próstata, podendo aumentar a densidade mineral óssea e reduzir a incidência de fraturas de quadril. Já Xgeva é utilizado mensalmente em pacientes com câncer de próstata ou mama e para a prevenção de complicações ósseas em pacientes com câncer ósseo metastático. O denosumab também está indicado para o tratamento de mieloma múltiplo (64, 69).

A eficácia do denosumab no tratamento de osteoporose no pós-menopausa foi determinada no estudo FREEDOM (Fracture Reduction Evaluation of Denosumab in Osteoporosis every 6 months). Na fase 3 desse estudo, os pacientes receberam injeções subcutâneas ou de 60 mg denosumab ou de placebo duas vezes por ano durante 3 anos. Nos pacientes que receberam denosumab, fraturas vertebrais, fraturas de quadril e fraturas não vertebrais foram reduzidos em 68, 40 e 20%, respectivamente. Outro estudo, DECIDE (Determining Efficacy: Comparison of Initiating Denosumab versus Alendronate), fez comparação entre os tratamentos que utilizavam denosumab e alendronato em mulheres no pós-menopausa durante um período de 12 meses e revelou que o denosumab foi mais eficaz no aumento DMO em comparação ao alendronato em todos os locais do esqueleto medidos (31, 64).

Outro estudo evidenciou que a administração subcutânea de 60 mg de denosumab cada 6 meses durante 36 meses em mulheres no pós-menopausa com osteoporose, reduzia o risco de fraturas vertebrais, não vertebrais e de quadril (65). O denosumab, portanto, reduz a reabsorção óssea e aumenta a massa e a resistência dos ossos corticais e trabeculares mantendo a microarquitetura óssea normal, sem evidências de efeitos adversos sobre a mineralização ou na formação de osso lamelar. (71, 72).

2.4.2 Mecanismo de ação

Denosumab age diminuindo o metabolismo ósseo por meio de um passo fundamental na diferenciação e ativação dos osteoclastos: inibe, especificamente, a ligação entre RANKL e seu receptor RANK, presente na membrana de células precursoras de osteoclastos e osteoclastos. Quando denosumab liga-se ao RANKL, impede o desencadeamento da fusão de precursores de osteoclastos e assim não há formação de osteoclastos maduros, também deixa de existir a estimulação da ligação dos osteoclastos ao osso e sua ativação, favorecendo, assim, sua apoptose. (28, 64, 69, 70, 73).

O tratamento com denosumab reduz rapidamente a taxa de remodelação óssea, resultando em rápida redução (de aproximadamente 70%) do marcador de reabsorção óssea tipo 1 no soro, o telopeptídeo C (CTX), no período de 6 horas, após a administração subcutânea, atingindo-se cerca de 85% de redução em 3 dias. Sua biodisponibilidade, após a injeção, é de 61% e sua absorção é mediada pelo sistema linfático. O tempo para se atingir a concentração plasmática máxima é de 10 dias (72) e não parece induzir a formação de anticorpos neutralizantes. (74)

2.4.3 Denosumab versus bisfosfonatos

O denosumab e os bisfosfonatos compartilham o mesmo propósito: a inibição da função dos osteoclastos com a diminuição da remodelação óssea para manter a densidade mineral óssea. Entretanto tais medicamentos possuem mecanismos de ação completamente diferentes. Enquanto os BFs devem ser internalizado na matriz óssea para atuar sobre os osteoclastos e com isso ficam armazenados e seus efeitos são reversíveis de maneira lenta após a interrupção do tratamento (9, 64) o denosumab está presente no meio extracelular e possui uma meia-vida de aproximadamente 26 dias (72), sendo assim, a reversão de seus efeitos se dá de maneira muito mais rápida (Figura 2.2).

Figura 2.2 – Mecanismos de ação dos bisfosfonatos e do denosumab.

BP: bisfosfonatos

Fonte: Adaptado de Baron (2011)

A distribuição pelo corpo também é uma diferença encontrada entre esses dois antirreabsortivos. Por ser um anticorpo, denosumab consegue se distribuir por todo o espaço ósseo conduzindo uma profunda inibição da remodelação por espaços nos quais os BFs não conseguem chegar por possuírem uma forte afinidade para com a hidroxiapatita e o mineral ósseo e assim não penetram de forma profunda nos espaços ósseos (9).

O tratamento prolongado de bisfosfonatos tem sido associado ao aumento do número de osteoclastos e de osteoclastos gigantes hiper-nucleados e com demora em sua apoptose. Além disso a inibição da atividade dos osteoclastos por bisfosfonatos poderia desencadear um ciclo de *feedback* que resultaria num aumento de RANK no ambiente perto do osso e que, por sua vez, poderia ajudar a estimular precursores de osteoclastos a se fundirem (48). Essa hipótese é suportada por evidências encontradas em um estudo realizado com ratas modificados para responder à IgG2 humana que tiveram seus ovários retirados e que foram tratadas

com denosumab resultando em um desaparecimento quase completos de osteoclastos (75).

Outra diferença verificada entre os efeitos antirreabsortivos de bisfosfonatos e denosumab é que o *turnover* ósseo em pacientes tratados com bisfosfonatos permanece baixo. Observou-se em alguns pacientes, que foram submetidos a exodontia e que estavam sendo tratados com bisfosfonatos, que o alvéolo não sofreu remodelação e permaneceu visível por meses ou anos. Isto se deu, provavelmente, porque os bisfosfonatos ligam-se covalentemente ao osso e permanecem lá por anos. Por outro lado, o efeito do denosumab, por ser um anticorpo, é temporário. Tem se demonstrado que a remodelação é retomada após a descontinuação do uso do medicamento. Um estudo conduzido por Ristow et al (76) apontaram achados de que há um aumento do *turnover* ósseo durante o uso do denosumab.

Por ser composto unicamente de aminoácidos e carboidratos, a metabolização do denosumab segue as vias de eliminação das imunoglobulinas, é eliminado por meio do sistema reticulo endotelial, resultando em degradação em pequenos peptídeos e aminoácidos, com menor probabilidade de toxicidade renal. Diferentemente dos bisfosfonatos que são excretados pelos rins e, conseqüentemente, o grau de comprometimento da função renal limita a sua utilização (64, 68, 77-79).

Quadro 2.1 – Principais diferenças entre os bisfosfonatos e o denosumab

Características	Bisfosfonatos	Denosumab
Química	Agente químico.	Anticorpo monoclonal.
Alvos	Absorção seletiva pela hidroxiapatita, Inibição da síntese de farnesil pirofosfato.	Ligação seletiva ao RANKL.
Distribuição	Superfície mineral óssea.	Circulação sanguínea e no fluido extracelular.
Principais células ósseas alvo	Osteoclastos maduros. Possíveis efeitos nos precursores dos osteoclastos e osteócitos.	Precursos dos osteoclastos e osteoclastos maduros.
Mecanismo de ação	Inibição da função reabsortiva e sobrevivência dos osteoclastos ao perturbarem as vias de sinalização intracelulares. Osteoclastos disfuncionais podem persistir.	Impede a formação, ativação e sobrevivência dos osteoclastos. Diminui o número de células osteocláticas.
Via de administração	Intra venosa ou via oral	Subcutânea
Duração de sua ação e reversibilidade dos efeitos	Depende do BF, Início de ação lento e reversibilidade demorada.	Totalmente reversível Início de ação relativamente rápido.
Contra-indicações	Gravidez, doença renal grave, hipocalcemia e hipersensibilidade a qualquer componente.	Gravidez, hipocalcemia, hipersensibilidade à substância ativa ou a qualquer componente.

Fonte: traduzido de Baron (2011)

2.4.4 Efeitos adversos

Foi relatado que pacientes tratados com denosumab tinham maior probabilidade de desenvolver hipocalcemia transitória nas primeiras semanas ou durante os primeiros 6 meses de uso do medicamento em comparação a pacientes que usavam bisfosfonatos, isso pode ocorrer devido ao diferente mecanismo de ação desses fármacos. Além disso pacientes que apresentam doenças crônicas nos rins possuem risco aumentado de desenvolver hipocalcemia sendo assim a prescrição adequada de cálcio e vitamina D pelo médico é recomendada pelo fabricante além do monitoramento de cálcio, magnésio e fosfato. Outro efeito adverso relatado é o risco de se desenvolver osteonecrose dos maxilares que se apresenta semelhante ao risco dos pacientes que utilizam bisfosfonatos (77, 78, 80).

2.5 OSTEONECROSE DOS MAXILARES RELACIONADA A ANTIRREABSORTIVOS

A osteonecrose dos maxilares é uma doença caracterizada pela morte do osso como consequência natural de uma ampla variedade de fatores locais e sistêmicos que comprometeram a circulação sanguínea no osso. Entre esses fatores estão hemoglobinopatias, defeitos nos sistemas trombóticos e fibrinolíticos, embolia gordurosa, alcoolismo, lúpus sistêmico eritematoso e terapia crônica com corticosteroides. Essa doença óssea tem sido descrita na literatura científica desde o século XIX e é frequentemente relacionada aos danos induzidos pela radioterapia em pacientes com tumores malignos de cabeça e pescoço, que, geralmente, leva à osteoradioneecrose (81, 82).

Já a ONM associada a bisfosfonatos (BRONJ), uma condição rara que ocorre em pacientes que estão recebendo terapia antirreabsortiva, foi relatada pela primeira vez em 2003, por Marx (2), como um caso de exposição óssea na mandíbula, insensível aos tratamentos adotados. Neste relato, o paciente fazia uso de bisfosfonato nitrogenado (ácido zolendrônico) via intravenosa mensalmente. Em 2010, ocorreu o primeiro relato de caso de ONM relacionada ao denosumab no qual

um paciente com histórico de câncer participava de um estudo comparativo, fase três, entre o denosumab e o ácido zoledrônico (83). Desde 2003, inúmeros artigos foram publicados relatando novos casos, entretanto a etiologia e fisiopatologia dessa doença ainda permanecem incertas. Por conseguinte, não há um consenso definitivo sobre sua prevenção e tratamento (49).

Em 2009, a Associação Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais (AAOMS - American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons) estabeleceu critérios que caracterizavam a ONM como a presença de uma área de osso exposto na região maxilofacial que não cura num período de 8 semanas, em pacientes que estavam recebendo ou tinha sido exposto previamente a uma terapia com bisfosfonatos e que não tinham recebido terapia de radiação para a região craniofacial (84). Em 2014 essa definição foi estendida a todos os antirreabsortivos e agentes anti-angiogênicos e, assim, uma nova nomenclatura foi atribuída: Osteonecrose dos maxilares relacionada à medicação (Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw - MRONJ) (85) Também foi observado desagregação do tecido mole, exposição do osso subjacente com intensa deficiência no fechamento da ferida (86).

2.5.1 Diagnóstico

Os primeiros sinais e sintomas podem ocorrer antes do desenvolvimento da osteonecrose clinicamente detectável e incluem dor profunda no osso e mobilidade dental sem relação com doença periodontal, traumas dentais; aumento de volume, eritema, ulceração e fístula sinusal. Pode ocorrer, também, sensação alterada na área afetada ou parestesia devido a compressão de feixes nervosos pela inflamação circundante. Entretanto áreas de osso exposto e necrótico podem permanecer assintomáticos por períodos prolongados de semanas, meses ou até mesmo anos (57, 87, 88).

Estas características podem ocorrer espontaneamente ou, mais comumente, em consequência de uma cirurgia dentoalveolar. A grande maioria dos autores descreveram a MRONJ ocorrendo em locais de cirurgia oral prévia, particularmente em locais de pós exodontias (87, 89). Fístulas intra e extra-orais podem

desenvolver-se quando a mandíbula ou a maxila necrótica se torna secundariamente infectada.(90).

Deve-se atentar que a sintomatologia dolorosa apresentada na MRONJ pode mimetizar aquela relacionada à osteíte alveolar, sinusite, gengivite/periodontite, cárie, lesões periapicais, lesão fibro-óssea, sarcoma, osteomielite esclerosante crônica e distúrbios da articulação temporomandibular (57). Já o quadro imaginológico pode ser confundido com osteomielite, osteorradionecrose, tumores ósseos e sequestros ósseos (57, 85).

2.5.2 Fisiopatologia da MRONJ

Embora haja extenso relato na literatura sobre casos de MRONJ, a fisiopatologia da doença não foi totalmente elucidada existindo, assim, propostas que tentam explicar a localização única da doença. Acredita-se que a remodelação óssea em geral é mais intensa no processo alveolar dos maxilares do que em outras partes do esqueleto. Além disso, o desenvolvimento da MRONJ é baseado em uma combinação de fatores de risco locais e sistêmicos. Existem, ainda, hipóteses como a remodelação alterada do osso ou sua supressão intensa, a inibição da angiogênese, regeneração epitelial retardada, microtraumas constantes, a supressão da imunidade inata ou adquirida, deficiência de vitamina D, toxicidade do BF ao tecido mole e inflamação ou infecção (85, 91-93).

Atualmente a hipótese mais aceita é centrada na intensa supressão da renovação óssea e as condições únicas dos ossos maxilares que são separados do ambiente bucal apenas por uma mucosa fina sendo esta facilmente violada por simples atividades mastigatórias. Além disso a cavidade oral é composta por inúmeras cepas bacterianas que podem estar envolvidas em infecções por meio do ligamento periodontal ou polpa dental. Achados histológicos em áreas de biópsias evidenciam a extensa colonização bacteriana (frequentemente *Actinomyces*) na superfície onde ocorria a remodelação óssea (57, 94).

Entretanto outros estudos sugerem que os macrófagos podem desempenhar um papel central na doença permitindo que a infecção local e necrose se estabeleça. Para Pazianas (2011), a hipótese de que a supressão intensa da

remodelação óssea seria a provável causa para o desenvolvimento da MRONJ é falha pois em doentes com osteopetrose o osso não é necrótico e a ONM não é uma complicação nos portadores da doença. A osteopetrose é uma doença óssea metabólica hereditária rara, caracterizada pelo aumento generalizado da densidade óssea devido a reabsorção osteoclástica defeituosa pela ausência de osteoclastos ou presença de osteoclastos não funcionais, levando à insuficiência da modelagem óssea com preenchimento da cavidade medular por matriz inorgânica, muitas vezes por completo, não permitindo o desenvolvimento das células hematopoiéticas. Assim, para o autor, mesmo que o tratamento com bisfosfonatos possa levar a uma neutralização completa ou eliminação dos osteoclastos, o resultado deveria ser osteopetrose e não osteonecrose (94, 95).

Pazianas (2011) acredita que ocorra um comprometimento de monócitos e macrófagos em número e capacidade funcional visto que macrófagos, assim como osteoclastos, absorvem os bisfosfonatos e a migração de monócitos é deficiente com o uso de denosumab. Isto poderia causar graves defeitos na segunda linha de defesa, sendo a primeira linha o epitélio da mucosa oral. Assim a função reduzida dessas células poderia tornar-se crítica para o desenvolvimento de infecção local, tornando a infecção o fator de início do desenvolvimento da MRONJ (94-96).

Porém para inúmeros pesquisadores embora os bisfosfonatos e o denosumab possuam diferentes mecanismos de ação ambos estão relacionados ao desenvolvimento dessa doença, sem diferenças entre maior risco frente a um medicamento ou outro, sugerindo de forma convincente que a supressão dos osteoclastos pode ser a fisiopatologia central da MRONJ (30, 93, 97, 98).

2.5.3 Fatores de risco

O risco de se desenvolver MRONJ aumenta com a duração do tratamento com o antirreabsortivo e com o aumento da dose. Além disso o risco irá depender do tipo de agente (bisfosfonatos nitrogenados ou não, por exemplo) e da via de administração (via intravenosa ou via oral) (57, 99, 100). Além disso fatores locais podem estar envolvidos no desenvolvimento da doença desencadeados por cirurgias. Pacientes com históricos de doenças inflamatórias como periodontite e

abscessos possuem risco 7 vezes maiores de desenvolver a doença (101). Tem-se observado que as lesões são encontradas com mais frequência em mandíbula do que em maxila (2:1) e em áreas com mucosa delgada e proeminências ósseas (93, 94, 102).

Embora a MRONJ possa ocorrer de forma espontânea o fator de risco apontado como principal são procedimentos dentários invasivos isso porque, teoricamente, traumatismos na mucosa, exposição óssea e de tecidos adjacentes à flora microbiana cria um meio inflamatório ácido. Os bisfosfonatos são liberados do tecido ósseo em um ambiente de baixo pH resultando na inibição da atividade dos osteoclastos e na desaceleração da remoção de detritos ósseos aumentando o desenvolvimento da osteomielite localizada. Infecções locais podem contribuir para os sintomas da MRONJ, porém a administração sistêmica de antimicrobianos não impede a progressão da doença já estabelecida. Como já se vem relatando na literatura em casos de MRONJ com osso exposto sem evidência clínica de infecções, é improvável que a infecção seja o evento inicial da MRONJ (30, 101).

Há um aumento da incidência de MRONJ em pacientes que tomam corticoesteróides atribuído ao seu efeito imunossupressor (95). Diabetes, fumo, uso de álcool, má higiene oral e fármacos quimioterápicos também são apontados como fatores de risco. Entretanto ainda não há estudos que comprovem com precisão se estão realmente associados à osteonecrose dos maxilares (100).

2.5.4 Prevenção e Tratamento

Estudos têm demonstrado que a primeira medida a ser realizada quando recebemos um paciente com indicação de terapia com antirreabsortivos é a realização de um exame clínico minucioso e detalhado da cavidade bucal com tomadas radiográficas afim de se determinar a real saúde bucal. Tendo isso em mãos, iniciar os tratamentos necessários para que se garanta uma adequação e a devolução completa da saúde bucal do paciente que irá se submeter a tal tratamento (85, 103). Foram encontradas evidências estatisticamente significantes quando pacientes foram submetidos a essas medidas preventivas sendo relatado uma redução de quase três vezes menos na incidência de MRONJ (104). A AAOMS

sugere a motivação e educação do paciente quanto aos cuidados bucais, tratamentos de cáries e doenças periodontais, aplicação de flúor, exodontias de raízes residuais e boa adaptação de próteses previamente ao início da terapia com o medicamento.

Extrações dentárias, uso de aparelhos ou presença de má higiene bucal foram observados em 80% dos casos de ONM tanto em pacientes que utilizavam ácido zoledrônico quanto em pacientes que faziam uso de denosumab (97).

Ainda não há um consenso na literatura a respeito de um protocolo padrão de tratamento desses pacientes assim o cirurgião dentista deve sempre optar por tratamentos conservadores, evitando debridamentos e ressecções pois tais tratamentos podem aumentar a área exposta ou piorar os sintomas do paciente. Porém se pacientes, que já fazem uso de antirreabsortivos, necessitarem de intervenções cirúrgicas é aconselhável a antibiótico terapia profilática. O antibiótico de escolha é a penicilina 500mg três vezes ao dia durante 14 dias e para pacientes alérgicos recomenda-se a combinação de quinolonas e metronidazol ou eritromicina e metronidazol, o uso de clindamicina é descartada pois seu espectro de ação não abrange *Actinomyces* (105), *Eikenella corrodens* e espécies similares (103, 106).

A utilização de antibioticoterapia profilática tem sido apoiada pois autores relataram que a adoção dessa medida, em procedimentos dentários invasivos, resultou em diminuição significativa dos casos de MRONJ (107, 108).

O uso de bochechos diários com clorexidina a 0,12% é recomendável para pacientes que apresentem osso necrótico exposto (85).

A câmara hiperbárica, utilizada em conjunto com procedimentos cirúrgicos é controverso. Autores alegam sua eficácia (109) e outros não acreditam que o uso possa trazer algum benefício pois a utilização desse tratamento se mostrou eficaz para osteorradionecrose e não para a MRONJ (103).

A terapia de fotobiomodulação (PBM) tem demonstrado resultados promissores como adjuvante no tratamento da MRONJ. Ela é uma terapia que utiliza formas não ionizantes de fontes de luz, incluindo lasers e diodos emissores de luz (LED) no espectro visível e infravermelho. É um sistema não térmico que envolve cromóforos endógenos que desencadeiam eventos fotofísicos e fotoquímicos em várias escalas biológicas. Promove vários benefícios tais como efeito modulador da inflamação e efeitos biomoduladores, alívio de dor e aceleração da reparação tecidual. A PBM modula os processos metabólicos celulares e também é capaz de

acelerar o processo de formação óssea, bem como a cicatrização de defeitos ósseos, fraturas e consolidação tardia; podendo atuar contra o processo de reabsorção óssea na osteoporose (110, 111).

Estudos apontam que há uma vantagem adicional para os pacientes com MRONJ quando utilizado a PBM em comparação ao tratamento sem essa terapia, sendo fácil de se administrar e não está associada a nenhum efeitos secundários conhecidos representando uma grande melhoria para o a qualidade de vida de muitos pacientes (112). Este tratamento tem a intenção de promover o crescimento celular e a angiogênese da área afetada, sendo muito utilizada em várias áreas das ciências biológicas para promover a regeneração dos tecidos (113).

Vescovi et al. (2007) utilizaram a terapia de fotobiomodulação com laser Nd:YAG em pacientes que possuíam MRONJ e relataram redução ou desaparecimento dos sintomas (dor, edema, sangramento ou presença de pus); reparação da mucosa ulcerada e tecido que cobria o osso exposto e cicatrização de fístulas (114).

A terapia fotodinâmica também vem apresentando resultados promissores para o tratamento nos casos no qual a lesão já está instalada ou para a prevenção do surgimento da mesma. Ela consiste em um processo de foto-oxidação da matéria orgânica, que na presença de um fotossensibilizador, oxigênio e irradiação luminosa, promove a formação de espécies reativas capazes de provocar a morte celular dos agentes infectantes (115). Vários estudos clínicos demostram que essa terapia representa um instrumento eficaz e seguro no tratamento de diversas condições clínicas atuando em organismos multirresistentes (116).

Uma ação antimicrobiana local é de suma importância em pacientes com lesões de osteonecrose relacionadas a medicação visto que o osso se encontra exposto ao meio bucal e em constante contato com a saliva desta forma fica impossível mantê-lo estéril. Um estudo publicado em 2016, por Hafner et al (117), avaliou comparativamente, in vitro, a ação da terapia fotodinâmica, da clorexidina e da polihexanida frente a bactéria *Actinomyces naeslundii*, que é uma espécie conhecida como colonizadora primária no interior da cavidade bucal e principal contribuinte para o biofilme e formação de placas (118). Além disso numerosos artigos apontam esta bactéria como o principal patógeno nas lesões de osteonecrose induzidas por antirreabsortivos (119, 120). Outro estudo in vitro, realizado por Rosa et al, mostrou a inativação do biofilme de *S. aureus* e a redução

da quantidade desse microrganismo em osso (121). Já Bisland et al realizou um estudo in vivo com ratos simulando a osteomielite e culturas de *S. aureus* evidenciando a redução da microbiota local, ressaltando uma característica importante da terapia fotodinâmica a respeito de sua atuação pontual especificamente para o local da infecção diminuindo o risco de morte da flora hospedeira e sendo benéfica para o indivíduo (122).

A AAOMS, em 2014, apresentou uma definição dos estágios da MRONJ, sua apresentação clínica e sugestões de tratamento.

Quadro 2.2 - Estadiamento e estratégias de tratamento

ESTADIAMENTO E ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO		
ESTÁGIO DE RISCO	Não há evidências de osso necrótico e sintomatologia	<ul style="list-style-type: none"> Análise clínica e radiográfica. Adequação do meio bucal e orientações gerais de higiene bucal devem ser sempre reforçadas.
ESTÁGIO 0 DA ONM	Não há evidências de osso necrótico e sintomatologia	<ul style="list-style-type: none"> Não há indicação de intervenção cirúrgica ou medicamentosa. Orientações de higiene Acompanhamento clínico e radiográfico.
ESTÁGIO 1 DA ONM	Osso necrótico exposto, assintomático e não há supuração	<ul style="list-style-type: none"> Bochechos com clorexidina 0,12% Orientações de higiene Acompanhamento clínico e radiográfico
ESTÁGIO 2 DA ONM	Osso necrótico exposto associado à infecção, dor e eritema na região com ou sem frenagem purulenta	<ul style="list-style-type: none"> Bochechos com clorexidina 0,12% Antibioticoterapia Debridamento superficial e retirada do osso necrótico. Acompanhamento clínico e radiográfico
ESTÁGIO 3 DA ONM	Osso necrótico exposto, dor, infecção e um ou mais critérios: osso necrótico se estendendo além da região de osso alveolar, fístulas extraorais, comunicação oral/nasal e/ou fratura patológica.	<ul style="list-style-type: none"> Bochechos com clorexidina 0,12% Antibioticoterapia Debridamento e ressecção da região com margem de segurança. Acompanhamento clínico e radiográfico

Fonte: Traduzido de Baron et al. (2011)

Acredita-se que pelo fato do denosumab e bisfosfonatos terem mecanismos de ação significativamente diferentes a ação farmacocinética do denosumab seria mais favorável para a resolução ou manejo dos pacientes com MRONJ (28).

Rupel et al, em uma revisão sistemática sobre todos os possíveis tratamentos para a MRONJ, ressaltam que ainda a abordagem cirúrgica conservadora para essas lesões parece ser, em geral, o método mais eficaz para resolução da doença (123). O sucesso do tratamento considerado paliativo chega de 20% a 50% dos casos quando comparado ao tratamento cirúrgico, 80% relatado na literatura. No entanto, a terapia conservadora pode ser útil, na verdade, pode ser necessária, quando a condição geral de um paciente não permite intervenção cirúrgica (124).

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a citotoxicidade, a proliferação e a capacidade migratória de fibroblastos em cultura, submetidos a diferentes concentrações de denosumab, utilizando a análise de atividade mitocondrial celular e o método *scratch*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Após aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) (Parecer número 1.824.898 – Anexo A), os experimentos foram realizados junto ao laboratório de Pesquisa Básica – Edmir Matson do Departamento de Dentística da FOUSP.

4.1 LINHAGEM CELULAR

Foi utilizado linhagens celulares de FMM1 de fibroblastos de mucosa bucal humana (125).

4.2 CULTIVO CELULAR

Um tubo criogênico, armazenado em nitrogênio líquido para a linhagem utilizada para o estudo, crioprotegidas em dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) foi descongelado em banho Maria a 37°C (Fanem, SP, Brasil) por 2 minutos. Para remover o DMSO, as células em suspensão foram transferidas para um tubo de centrifugação contendo 10 ml de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brasil). Em seguida, centrifugadas a 300g durante 5 minutos, à temperatura ambiente (Centrífuga Excelsa Baby I modelo 206 - Fanem, SP, Brasil). Após a aspiração do sobrenadante, o precipitado de células, resultante da centrifugação, foi ressuspendido em 1 ml de DMEM fresco. A suspensão das células transferida para um frasco de 25 cm² contendo 5 ml de DMEM com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma) e foi mantida em estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar (VECO – Campinas, SP, Brasil), seguindo os protocolos para manutenção da esterilidade dos materiais, suplementos e meios de cultura.

A monitorização do crescimento celular foi realizada diariamente utilizando-se microscópio invertido de fase e o meio de cultura foi trocado a cada 2 dias, de acordo com o metabolismo celular.

Após ocuparem 70% da área cultivável do frasco, processo denominado subconfluência, as células foram subcultivadas. Para tal, o meio de cultura do frasco foi transferido para um tubo de centrifugação e a monocamada celular lavada uma vez com solução tampão fosfato-salina, sem cálcio e magnésio (PBSA), pH 7,2. A seguir, as células foram separadas com 2 ml de solução de tripsina a 0,25% (Sigma) em PBSA, durante 3 minutos, a temperatura de 37°C.

Para a inativação da tripsina foi utilizado o meio de cultura reservado anteriormente no tubo de centrifugação contendo soro fetal bovino. As células em suspensão com a tripsina inativada foram transferidas para um tubo e centrifugadas a 300g durante 5 minutos, à temperatura ambiente.

O sobrenadante foi removido e o precipitado de células ressuspensionado em 1 ml de meio de cultura fresco.

Para a perpetuação da linhagem celular, frações de suspensões de células foram subcultivadas em novos frascos, procedimento que deu origem a novas passagens da cultura. Para todo o experimento foram utilizadas células entre a quinta e a décima passagem.

Figura 4.1 –Fotomicrografia células em subconfluência. Linhagem FMM1 – aumento 100x

12hs

24hs

4.3 SUBSTÂNCIA TESTADA

Substância utilizada para a realização do experimento:

- Prolia 60 mg. (GSK - GlaxoSmithKline Brasil Ltda)
- Fórmula molecular: $C_{6404}H_{9912}N_{1724}O_{2004}S_{50}$

O produto é apresentado em 1 seringa preenchida (1,0 ml). Para a realização dos experimentos foram feitas 10 alíquotas de 100µl cada armazenadas sob refrigeração indicada pelo fabricante (temperatura de 2°C a 8°C, protegido da luz).

4.4 GRUPO EXPERIMENTAL

Os grupos foram divididos em:

Grupo Controle – não receberam a medicação

Grupos Testes –

Grupo $10^{-3}\mu\text{g}$ - receberam a medicação na concentração $10^{-3}\mu\text{g}$,

Grupo $10^{-4}\mu\text{g}$ - receberam a medicação na concentração $10^{-4}\mu\text{g}$,

Grupo $10^{-5}\mu\text{g}$ - receberam a medicação na concentração $10^{-5}\mu\text{g}$,

Grupo $10^{-6}\mu\text{g}$ - receberam a medicação na concentração $10^{-6}\mu\text{g}$,

Grupo $10^{-7}\mu\text{g}$ - receberam a medicação na concentração $10^{-7}\mu\text{g}$.

Para se obter tais concentrações foram realizadas diluições seriadas. A primeira concentração obtida foi a de $10^{-3}\mu\text{g}$ no qual 100µl de denosumab foram adicionados a 900µl de meio fresco. Após é acrescentado 9ml desse meio fresco obtendo-se a concentração desejada. Em seguida, para as diluições seriadas, retira-se 1ml do meio com concentração de 10^{-3} e adiciona-se 9ml de meio fresco obtendo-se a concentração de $10^{-4}\mu\text{g}$ e assim por diante até se conseguir todas as concentrações desejadas.

4.5 EXPERIMENTO

Para a determinação do número de células existentes no frasco original os precipitados foram ressuspensas em 1 ml de PBSA, e 0,1ml dessa suspensão celular foi dispensada em um tubo de ensaio, onde foram adicionados 0,8ml de PBSA e 0,1ml de Azul de Trypan a 0,4%. Posteriormente, algumas gotas dessa mistura foram transferidas para uma câmara de Neubauer que, em seguida foi levada ao microscópio invertido de fase para a realização da contagem do número de células.

A suspensão celular restante (0,9ml) foi novamente centrifugada, o sobrenadante aspirado e o precipitado de células resultante da centrifugação ressuspensado em 1 ml de meio de cultura fresco. Dependendo do número de células existentes no frasco original foi adicionado a essa suspensão uma determinada quantidade de DMEM, de modo que se tornou possível a obtenção de 1000 células em cada 100µl, conforme metodologia descrita por Freshney (2000). Tal suspensão de células foi plaqueada em placas de 96 poços distribuindo 1000 células para cada poço em cada grupo experimental. Para garantir homogeneidade na distribuição das células entre os poços foi utilizado um pipetador multicanal.

Figura 4.2 – Esquema de plaqueamento em placa de 96 poços demonstrando. Distribuição dos grupos experimentais

4.5.1 Viabilidade Celular

Após o cultivo celular, as células foram semeadas em placas de 96 poços, na contagem de 1000 células por poço, em 100µl de meio DME fresco, sendo realizadas 8 réplicas para cada grupo experimental a ser testado.

Após o período de 24 horas, aguardado para aderência das células ao fundo dos poços, os meios de cultivo foram removidos e substituídos por 200µl dos meios de cultivo contendo as diversas concentrações do denosumab que foram adicionadas aos respectivos poços na placa de cultivo. Nos poços do grupo controle foram colocados 200µl de meio fresco. Os meios de cultivo contendo o denosumab ou não (controle) foram mantidos em contato com as células por 24 horas. A seguir para realização do teste de atividade mitocondrial (MTT) os meios foram removidos dos poços que receberam 100µl de meio de cultivo fresco e 10µl de solução 12mM MTT (reagente A).

Após um período de incubação de 4 horas, o reagente A foi removido e adicionado 100 µl de solução tampão glicina SDS-HCL (reagente B), homogeneizando cada poço com o auxílio de uma pipeta para realização de mistura entre os componentes. Após 15 minutos a placa foi colocada em espectrofotômetro para leitura da absorbância, com filtro de 570 nm.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5.2 Proliferação Celular

Para análise da proliferação celular foi observado o crescimento celular, em 4 períodos, tratadas com todas as concentrações do denosumab.

Foi analisada a viabilidade celular que indiretamente forneceu o número de células viáveis no decorrer do tempo experimental de 72 horas. Os dados do teste de redução do MTT foram utilizados para a construção de curvas de crescimento celular.

Para se realizar estas curvas foram plaqueadas 4 placas de 96 poços (1000 células por poço) uma para cada tempo experimental de zero, 24, 48 e 72 horas. Em

cada placa foi semeado 8 réplicas de cada grupo experimental. No tempo zero, ou seja, 24 horas após o contato das células com os meios condicionados, a primeira placa de 96 poços foi analisada pelo teste do MTT. As demais placas tiveram metade dos seus meios substituídos por meio fresco, com o objetivo de diluir de maneira gradativa os meios condicionados, mimetizando o que ocorre com a droga *in vivo*. Vinte e quatro horas após, a placa de 24 horas foi submetida ao teste do MTT e as demais placas tiveram novamente metade dos seus meios substituídos por meio de cultura fresco. E assim por diante até a obtenção dos dados da placa de 72 horas.

Os dados de densidade óptica (DO) foram utilizados para a construção de um gráfico de crescimento para cada grupo experimental.

4.5.3 Migração Celular

Para migração celular foi utilizado o método *Scratch*, baseado na criação de uma interrupção de continuidade de uma monocamada celular, ou ferida, e o acompanhamento do fechamento desta ferida foi realizado por observação em microscópio invertido de fase (126).

Na análise da migração celular, as células foram cultivadas em condições normais de nutrição e plaqueadas na densidade de $2,5 \times 10^5$ células por placa de cultivo tipo Petri 60 mm com 2ml de meio fresco, em triplicata por grupo experimental. As placas foram incubadas durante 24 horas em estufa de CO₂ a 37°C.

Após a constatação da confluência da monocamada foi realizado o ensaio de *Scratch* fazendo a ferida, ou seja, uma linha reta na monocamada com a ponta da pipeta p200. A seguir, os debris formados foram removidos, lavando-se a placa uma vez com 1ml de meio fresco e em seguida, as placas receberam 2ml de meio fresco (Grupo controle) ou os meios com as diferentes concentrações de denosumab (Grupos experimentais). O teste de migração foi realizado nos tempos 0, 12, 24 e 48 horas.

As imagens foram capturadas com câmera digital acoplada ao microscópio invertido de fase, utilizando *software* NIS Elements F 3.2, sendo obtidas do mesmo campo de visão da ferida, criando pontos de referência na parte externa da placa e na platina do microscópio com marcadores de ponta fina. O posicionamento das placas também foi auxiliado por um suporte para placa tipo Petri. Com os pontos de referência e o suporte, as placas foram levadas ao microscópio invertido de fase, posicionando os pontos de referência para captura da primeira imagem, tempo zero. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C e no período de 12, 24 e 48 horas e as mesmas placas foram levadas novamente ao microscópio invertido de fase e colocadas na mesma posição com o auxílio dos pontos de referência para obter imagens sempre na região fotografada no tempo zero.

Com a obtenção das imagens, as amostras foram analisadas quantitativamente usando identificação do núcleo celular, o que permitiu a contagem do número de células presentes na área da ferida, previamente definida, obtendo-se a quantidade de célula por área (Índice de migração celular) em cada tempo experimental.

Figura 4.3 – **(A)** método *Scratch*, fazendo a ferida com a ponta da pipeta p200. **(B)**: fotomicrografia de fase do campo de visão da ferida no tempo zero. **(C)**: fotomicrografia de fase do campo de visão da ferida após migração de células para área definida no tempo 12 horas

* Marcação do núcleo celular para contagem de células por área definida (retângulo vermelho mesma área de visualização para todas as análises e colocada no centro de cada fotomicrografia).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados tanto dos testes de citotoxicidade, transformados em porcentagem com relação ao controle, quanto das DOs das curvas de crescimento e migração celular foram analisados pelo método ANOVA – 1 critério, complementado pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Foi utilizado o programa estatístico BioEstat versão 5.4. (<http://www.mamiraua.org.br/downloads/programas>).

5 RESULTADOS

5.1 VIABILIDADE

Os dados da atividade mitocondrial, determinados pela mensuração da DO pelo teste de MTT, foram transformados em porcentagem em relação ao controle considerado 100% de viabilidade a média dos dados de MTT do grupo controle.

Os fibroblastos da linhagem FMM1, após serem submetidos ao meio de cultivo contendo o denosumab nas concentrações de 10^{-3} μ g a 10^{-7} μ g não apresentaram diferença estatisticamente significativa de viabilidade celular em nenhuma concentração. ($p < 0,05$)

Gráfico 5. 1 - Viabilidade celular: média da linhagem FMM1 em resposta a diferentes concentrações de denosumab

Esses resultados nos levaram a verificar se a porcentagem das células sobreviventes manteria ou não sua capacidade proliferativa, levando à realização do teste de proliferação celular.

5.2 PROLIFERAÇÃO CELULAR

O gráfico 5.2 ilustra as barras de crescimento dos fibroblastos da linhagem FMM1 dos diversos grupos experimentais nos tempos entre zero e 72 horas do experimento de proliferação celular. Houve crescimento significativo no controle e em todos os grupos experimentais. Não há diferença de crescimento celular entre os grupos.

Gráfico 5.2 – Médias do crescimento celular da linhagem FMM1 submetidos a diferentes concentrações de denosumab

★ Número de células viáveis, significativamente maior que as células do mesmo grupo experimental no tempo 24 horas (crescimento significativo $p < 0,05$). Os dados são as médias e as barras o erro padrão da média

5.3 MIGRAÇÃO CELULAR

Na figura 5.1 temos imagens representativas da migração celular nos tempos experimentais 0 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas. No último tempo pode-se observar o fechamento total da ferida.

Figura 5.1 – Migração celular

Fotomicrografia de fase de células FMM1 no ensaio de migração na área definida da ferida tempos experimentais de 0, 12, 24 e 48 horas. **(A)** grupo 10^{-4} em 0 horas **(B)** grupo 10^{-3} em 12 horas **(C)** grupo 10^{-4} em 24 horas e **(D)** grupo controle em 48 horas. Aumentos original de 100x

Houve migração celular em todos os grupos experimentais, não havendo diferença estatisticamente significantes entre o grupo controle e os demais grupos. O fechamento foi similar para todos no tempo 48 horas impossibilitando a contagem do número de células no interior da ferida. Dentro de cada grupo experimental, quando analisado os tempos experimentais, houve crescimento estatisticamente significativo.

O gráfico 5.3 ilustra os índices médios de migração nos diferentes tempos experimentais. Não houve diferença no índice de migração entre o grupo controle e os grupos experimentais em nenhum tempo experimental

Gráfico 5.3 – Representação gráfica dos índices de migração celular (número de células / área da ferida).

A migração celular foi analisada após contato dos meios condicionados com diferentes concentrações do denosumab:

★ Número de células na ferida significativamente maior que o número de células do mesmo grupo experimental no tempo 24 horas (crescimento significativo $p < 0,05$)

6 DISCUSSÃO

Enquanto a exata fisiopatologia da MRONJ não é estabelecida muitas hipóteses e pesquisas vêm sendo desenvolvidas a fim de se esclarecer os motivos reais pelos quais a terapia com antirreabsortivos leva à tão debilitante doença. É evidente que a diminuição da atividade dos osteoclastos, infecção, trauma, desempenham papéis importantes e bem demonstrados pela literatura. Entretanto com o emprego do denosumab, teorias prévias aplicadas aos bisfosfonatos tornaram-se duvidosas como, por exemplo, a vascularização reduzida. Sabe-se que os BFs possuem ação antiangiogênica, porém o denosumab não interfere na angiogênese. Outro fator seria a citotoxicidade de compostos nitrogenados aos tecidos moles o que favoreceria o rompimento da mucosa tornando-a susceptível a infecções e posteriormente ao desenvolvimento da MRONJ. Assim nosso trabalho objetivou contribuir para o esclarecimento de sua fisiopatologia além de tentar observar se o denosumab está comprometendo a reparação das feridas bucais considerando que ainda não existem relatos concretos na literatura sobre seus efeitos nos fibroblastos.

Apesar de ser um medicamento novo, muito se sabe sobre os mecanismos de ação e resultados obtidos com o denosumab. Entre seus efeitos adversos, a MRONJ, foi logo relatada na literatura e uma proposta para sua ocorrência foi apresentada. O fato de bisfosfonatos e denosumab serem potentes supressores da remodelação óssea pela inativação dos osteoclastos já está bem sedimentado como um mecanismo que favorece a MRONJ. Entretanto a renovação óssea suprimida por si só não explica os mecanismos de inflamação dos tecidos moles e necrose observados (49).

Os testes utilizados em nosso trabalho visaram contribuir para o entendimento do comportamento dos fibroblastos frente ao contato com a droga. A escolha das concentrações utilizadas se deu de forma empírica, visto que há pouquíssimos estudos in vitro dessa medicação com esse tipo celular. Foi possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na viabilidade dos fibroblastos de mucosa quando comparamos o grupo controle aos grupos experimentais e seu crescimento não foi alterado independente da concentração da

droga. Demonstrando que essa droga não é citotóxica para os fibroblastos em cultura.

Os nossos resultados diferem de outros autores quando comparamos os efeitos causados pelo denosumab e bisfosfonatos sobre a citotoxicidade nos fibroblastos e tipos celulares dos tecidos moles. Estudos *in vitro* demonstraram que os bisfosfonatos possuem efeito citotóxico direto sobre os fibroblastos (49). Como observado por Brozowski (2011), em seu estudo *in vitro*, em que diferentes concentrações de alendronato sódico foram citotóxicos aos fibroblastos e osteoblastos comprometendo sua viabilidade e proliferação. Correia et al. (2006) também encontraram os mesmos resultados em seus estudos utilizando cultura de células originadas do ligamento periodontal humano. Ambos autores demonstraram uma relação de dose/ efeito em que maiores concentrações possuem efeitos deletérios maiores (127, 128).

Açil et al. (2012), em estudos *in vitro*, relataram a diminuição da proliferação de osteoblastos e de fibroblastos e a diminuição da produção de colágeno quando estas células foram colocadas em contatos com diferentes tipos e concentrações de bisfosfonatos (129). Entretanto McLeod et al. ressaltam que em baixas concentrações os BPs parecem ter pouco efeito sobre a proliferação e migração de fibroblastos ou queratinócitos ao passo que em altas concentrações as drogas são significativamente tóxicas e, assim, advertem que uma das principais questões em estudos *in vitro* é a verdadeira concentração de exposição dos tecidos ao medicamento estudado porque a utilização de concentrações de BFs *in vitro* são comparáveis às concentrações plasmáticas imediatamente após a administração, e, por conseguinte, questionável, pois as células, *in vivo*, não ficam submetidas a estas concentrações durante períodos prolongados. Com isso não há nenhuma evidência clara de que as concentrações utilizadas nos estudos possam ser encontradas em torno das células da mucosa oral (130) tornando questionável a hipótese de que indução de toxicidade celular pelo BFs seja o principal mecanismo fisiopatológico da MRONJ, porque os tecidos moles da boca nunca são expostos às concentrações necessárias de indução de morte celular *in vitro*.

Para a realização do estudo de proliferação celular dos fibroblastos, tentou-se simular uma situação clínica, quando realizamos a diluição do meio de cultura contendo as diferentes concentrações de denosumab durante os tempos experimentais. Isso simularia o que ocorre *in vivo*, quando em um primeiro momento

temos uma concentração maior e com a metabolização da droga essa concentração tende a diminuir.

Ravosa et al. (2015), para avaliar o papel da terapia com bisfosfonatos na reparação das feridas bucais, estudaram os efeitos do ácido zoledrônico sobre a proliferação, apoptose e migração de fibroblastos e de linhagens do epitélio bucal e demonstraram que fibroblastos são significativamente mais susceptíveis à apoptose do que as células epiteliais e que o medicamento pode inibir a síntese de colágeno intersticial feita por fibroblastos. Em nosso trabalho observamos que o denosumab é biocompatível permitindo, assim, que a célula continue a desenvolver suas atividades normalmente.

Vale ressaltar que a reparação de feridas *in vivo* requer a deposição de colágeno para estimular a re-epitelização. A reparação, após uma exodontia, é iniciada pelo coágulo e a formação de um tecido de granulação, seguida pela migração de fibroblastos para dentro da ferida, a proliferação e a deposição de colágenos para aumentar a resistência. Em sequência, a apoptose dos fibroblastos cria um ambiente rico em colágeno e essa matriz provisória é essencial para a formação de um leito de ferida saudável para posterior migração de células epiteliais. Os experimentos realizados por Ravosa suportam que o tratamento com ácido zolendrônico impede a reparação tecidual dos tecidos moles da boca, bloqueando a expressão de colágeno por fibroblastos, resultando num déficit de deposição do tecido de granulação rico em colágeno necessário para a re-epitelização. Por meio deste mecanismo, o bisfosfonato liberado do osso após uma extração dentária pode atrasar a reparação de feridas da mucosa bucal e contribuir para fisiopatogênia da osteonecrose (86).

Em comparação com os achados de Ravosa, nossos resultados mostraram que o denosumab não interfere na migração celular possuindo um índice de migração celular igual para todos os grupos experimentais e com isso a migração de fibroblastos para dentro de uma ferida, durante o processo de reparação tecidual, não é afetada pela ação direta do denosumab.

Encontramos relatos na literatura de que os bisfosfonatos possuem propriedade antiangiogênica e tem-se sugerido que isto também pode contribuir para a MRONJ. Entretanto não foi demonstrado tais efeitos com o uso do denosumab e achados histológicos demonstram um sistema vascular normal (87, 131). Misso et al (2012) realizaram um estudo *in vitro* e *in vivo* comparativo entre o denosumab e o

ácido zoledrônico para avaliar os seus efeitos antiangiogênicos. Observaram que o ácido zoledrônico induz a inibição do crescimento e diminuição da proliferação e formação do tubo capilar, induzindo à apoptose em células endoteliais de veia umbilical humana. Diferentemente dos resultados encontrados com o denosumab que se manteve inerte a essas células não inibindo a formação desse tipo celular, sugerindo que a inibição do RANKL pelo denosumab não leve a efeitos antiangiogênicos e, de acordo com os ensaios *in vitro*. Nenhuma atividade antiangiogênica foi observada nos estudos *in vivo* com ratos. No entanto os resultados *in vivo* já eram esperados visto que o denosumab é um anticorpo monoclonal humano e não se liga ao RANK de ratos (132).

Kuroshima et al. (2016) apresentaram uma hipótese de que o tratamento com denosumab aumente o número de TRAP (+) MNC - fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) células mononucleares (MNCs) - na medula óssea e nas feridas bucais. Em seu estudo, eles utilizaram ratos tratados com anticorpo monoclonal de ratos para RANKL (RANKL anti-mAb) e verificaram que macrófagos e fibroblastos gengivais não sofreram quaisquer alterações frente a esse medicamento corroborando para os resultados encontrados em nossos estudos de que o denosumab não altera as funções de células que possuem suas funções ativadas pelo RANKL. Os autores sugerem que o aumento de TRAP (+) MNC, observado está associado com a supressão dos osteoclastos. Nos animais utilizados no experimento, observou-se uma estimulação de precursores de osteoclastos na medula óssea. Entretanto isso não se traduziu em um aumento do número de osteoclastos multinucleados pois o medicamento inibia a diferenciação e sobrevivência dos precursores de osteoclastos e sinais pró-osteoclastos continuaram a serem enviados, provavelmente devido a insatisfatória osteoclastogênese, podendo resultar no acúmulo de TRAP (+) MNC no osso e com isso como células T expressam RANKL haveria um recrutamento de células do sistema imune e como muitas delas estão associadas a doenças inflamatórias a supressão dos osteoclastos poderia marginalmente influenciar o sistema imunitário e manter uma inflamação nas feridas orais (133).

Como citado anteriormente o fechamento da ferida pelas células epiteliais bucais e fibroblastos gengivais é importante, não só para a reparação de feridas bem-sucedida, mas também para a proteção da cavidade oral de infecções bacteriana após exodontias. Além disso, a capacidade das células epiteliais de

migrar e sintetizar colágeno do tipo I é essencial para a formação de tecido conjuntivo gengival rígido para cobrir a exposição de osso intra-oral, protegendo o osso alveolar da maxila e da mandíbula de infecção bacterianas. Assim, em pacientes que fazem terapias com bisfosfonatos, é possível que uma infecção bacteriana bucal possa induzir MRONJ, em cooperação com outros fatores de risco, visto que muitos estudos já comprovaram que BFs, com compostos nitrogenados, reduzem a viabilidade e a capacidade de migração de fibroblastos, de células osteogênicas e de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) (134, 135) afetando a função e sobrevivência dos tipos celulares envolvidos no processo de reparação tecidual.

Muitos estudos têm demonstrado a superioridade do denosumab em relação aos bisfosfonatos quanto seus efeitos no tecido ósseo. Lipton et al. (2012) analisaram mais de 5700 pacientes com câncer avançado e apontaram que a inibição de RANKL com denosumab proporcionou eficácia superior para a prevenção em pacientes com metástases ósseas quando comparado ao ácido zoledrônico, sem a carga adicional de toxicidade. O perfil de segurança do denosumab representa uma melhoria em relação ao ácido zoledrônico pois não demonstra nenhum efeito na função renal e pode ser utilizado em pacientes sem a necessidade de ajustar doses ou monitorar o estado dos rins (136). Zebaze et al. (2014) verificaram, através do CTX sérico, que o denosumab reduziu a remodelação mais rapidamente e mais completamente do que o alendronato. Além disso também verificaram uma redução na porosidade maior quando comparado ao bisfosfonato. (51) Denosumab também se mostrou superior ao alendronato na melhora da densidade mineral óssea da cortical medida por tomografia computadorizada (137).

Ristow et al. (2014) descobriram que há uma diferença entre os efeitos antirreabsortivos dos bisfosfonatos e do denosumab. A reposição óssea em pacientes tratados com bisfosfonatos permanece baixa isso foi verificado em muitos pacientes nos quais os alvéolos, após extrações, não foram remodelados e permaneceram visíveis por meses ou anos. Provavelmente isto ocorra porque os bisfosfonatos se ligam covalentemente ao osso e permanecem ali por anos. Em contraste, os autores descreveram que há um aumento no *turnover* ósseo quando o denosumab está sendo administrado e como ele é um anticorpo seus efeitos são temporários assim demonstraram que a remodelação do osso mandibular é retomada quando o denosumab é descontinuado (76).

Para alguns autores a patogênese da MRONJ está diretamente relacionada aos efeitos dos BFs sobre células epiteliais e fibroblastos (86, 138, 139) e este modelo é suportado por dados clínicos que mostram a desagregação do tecido mole acompanhada pela exposição do osso subjacente, sugerindo que a toxicidade dos BFs aos tecidos moles pode contribuir para o aparecimento dessa doença. Entretanto, com base nos resultados obtidos em nosso estudo, não podemos apoiar tal posicionamento, pelo menos em relação à MRONJ relacionada ao denosumab, pois nossos resultados mostram que o denosumab não provocou quaisquer efeitos, independentemente de sua concentração, nos fibroblastos. A viabilidade, proliferação e migração desse tipo celular não sofreu alteração. Assim podemos supor que a fisiopatogenia da MRONJ relacionada ao denosumab está mais associada aos efeitos dos medicamentos no tecido ósseo, como a supressão da remodelação óssea e morte dos osteoclastos, do que dos efeitos do medicamento aos tecidos moles, visto que o denosumab não apresenta citotoxicidade aos fibroblastos. Porém mais estudos devem ser realizados afim de se compreender melhor os mecanismos que levam a ocorrência dessa lesão.

7 CONCLUSÃO

Dentro das condições metodológicas desse estudo podemos concluir que o denosumab:

- Não é citotóxico para fibroblastos em cultura, independentemente de sua concentração
- Não interfere na capacidade proliferativa dos fibroblastos.
- Não interfere na capacidade migratória dos fibroblastos.

REFERÊNCIAS¹

1. Diz P, López-Cedrún JL, Arenaz J, Scully C. Denosumab-related osteonecrosis of the jaw. *J Am Dent Assoc.* 2012;143(9):981-4.
2. 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.
3. Williamson RA. Surgical management of bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2010;39(3):251-5.
4. Palaska PK, Cartsos V, Zavras AI. Bisphosphonates and time to osteonecrosis development. *Oncologist.* 2009;14(11):1154-66.
5. Durie BG, Katz M, Crowley J. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates. *N Engl J Med.* 2005;353(1):99-102; discussion 99-.
6. Filleul O, Crompton E, Saussez S. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a review of 2,400 patient cases. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010;136(8):1117-24.
7. Almazroo SA, Woo SB. Bisphosphonate and nonbisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a review. *J Am Dent Assoc.* 2009;140(7):864-75.
8. Russell G, Mueller G, Shipman C, Croucher P. Clinical disorders of bone resorption. *Novartis Found Symp.* 2001;232:251-67; discussion 67-71.
9. Baron R, Ferrari S, Russell RG. Denosumab and bisphosphonates: different mechanisms of action and effects. *Bone.* 2011;48(4):677-92.
10. Saad F, Brown JE, Van Poznak C, Ibrahim T, Stemmer SM, Stopeck AT, et al. Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. *Ann Oncol.* 2012;23(5):1341-7.
11. Yan Y, Lin X, Dai X, Wang G, Zhang L, Zou H. [Research progress of regulation of osteoclast formation and function]. *Zhongguo Xue Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2014;28(11):1435-40.
12. Brown JP, Josse RG, Canada SACotOSo. 2002 clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada. *CMAJ.* 2002;167(10 Suppl):S1-34.
13. U. AS, S. SVA, C. PA, R. CY, F RR. Effect of estrogen deficiency on bone turnover and bone repair. *J Bras Patol Med Lab.* 2006;v. 42:p 5-12.

¹ De acordo com Estilo Vancouver

14. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.* 2002;8(3):147-59.
15. Duong LT, Rodan GA. Regulation of osteoclast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord.* 2001;2(1):95-104.
16. Takayanagi H. Osteoimmunology and the effects of the immune system on bone. *Nat Rev Rheumatol.* 2009;5(12):667-76.
17. Boyde A, Ali NN, Jones SJ. Resorption of dentine by isolated osteoclasts in vitro. *Br Dent J.* 1984;156(6):216-20.
18. Frost HM. A new direction for osteoporosis research: a review and proposal. *Bone.* 1991;12(6):429-37.
19. Rodan SB, Rodan GA. Integrin function in osteoclasts. *J Endocrinol.* 1997;154 Suppl:S47-56.
20. Martin TJ, Sims NA. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med.* 2005;11(2):76-81.
21. Faloni A, Cerri P. Cellular and molecular mechanisms of the estrogen in the bone resorption. *Rev Odontol UNESP.* 2007;36 (2):181-8.
22. Weitzmann MN. T-cells and B-cells in osteoporosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2014;21(6):461-7.
23. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* 2001;142(12):5050-5.
24. Liu JZ, Ji ZL, Chen SM. [The OPG/RANKL/RANK system and bone resorptive disease]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 2003;19(6):655-60.
25. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther.* 2007;9 Suppl 1:S1.
26. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998;93(2):165-76.
27. Schmiedel BJ, Scheible CA, Nuebling T, Kopp HG, Wirths S, Azuma M, et al. RANKL expression, function, and therapeutic targeting in multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* 2013;73(2):683-94.
28. Malan J, Ettinger K, Naumann E, Beirne OR. The relationship of denosumab pharmacology and osteonecrosis of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012;114(6):671-6.
29. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 2008;473(2):139-46.

30. Aghaloo TL, Cheong S, Bezouglaia O, Kostenuik P, Atti E, Dry SM, et al. RANKL inhibitors induce osteonecrosis of the jaw in mice with periapical disease. *J Bone Miner Res*. 2014;29(4):843-54.
31. Sinningen K, Tsourdi E, Rauner M, Rachner TD, Hamann C, Hofbauer LC. Skeletal and extraskeletal actions of denosumab. *Endocrine*. 2012;42(1):52-62.
32. Tekkesin MS, Mutlu S, Olgac V. The role of RANK/RANKL/OPG signalling pathways in osteoclastogenesis in odontogenic keratocysts, radicular cysts, and ameloblastomas. *Head Neck Pathol*. 2011;5(3):248-53.
33. Peng X, Guo W, Ren T, Lou Z, Lu X, Zhang S, et al. Differential expression of the RANKL/RANK/OPG system is associated with bone metastasis in human non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 2013;8(3):e58361.
34. Muschitz C, Fahrleitner-Pammer A, Huber J, Preisinger E, Kudlacek S, Resch H. Update on denosumab in postmenopausal osteoporosis--recent clinical data. *Wien Med Wochenschr*. 2012;162(17-18):374-9.
35. Raju R, Balakrishnan L, Nanjappa V, Bhattacharjee M, Getnet D, Muthusamy B, et al. A comprehensive manually curated reaction map of RANKL/RANK-signaling pathway. *Database (Oxford)*. 2011;2011:bar021.
36. Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA*. 2004;292(4):490-5.
37. Hofbauer LC, Neubauer A, Heufelder AE. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases. *Cancer*. 2001;92(3):460-70.
38. Sato K, Lee JW, Sakamoto K, Iimura T, Kayamori K, Yasuda H, et al. RANKL synthesized by both stromal cells and cancer cells plays a crucial role in osteoclastic bone resorption induced by oral cancer. *Am J Pathol*. 2013;182(5):1890-9.
39. Tay JY, Bay BH, Yeo JF, Harris M, Meghji S, Dheen ST. Identification of RANKL in osteolytic lesions of the facial skeleton. *J Dent Res*. 2004;83(4):349-53.
40. Hofbauer LC. Pathophysiology of RANK ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG). *Ann Endocrinol (Paris)*. 2006;67(2):139-41.
41. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis. Scientific Advisory Board, Osteoporosis Society of Canada. *CMAJ*. 1996;155(8):1113-33.
42. DK k, R R, DR M. Drugs for the treatment of osteoporosis: Review. *Rev Bras Reumatol*. 2011;51 (4):365-82.
43. Lirani-Galvão AP, Lazaretti-Castro M. Physical approach for prevention and treatment of osteoporosis. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2010;54(2):171-8.

44. Brown JP, Prince RL, Deal C, Recker RR, Kiel DP, de Gregorio LH, et al. Comparison of the effect of denosumab and alendronate on BMD and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with low bone mass: a randomized, blinded, phase 3 trial. *J Bone Miner Res*. 2009;24(1):153-61.
45. Rossini M, Adami S, Bertoldo F, Diacinti D, Gatti D, Giannini S, et al. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of osteoporosis. *Reumatismo*. 2016;68(1):1-39.
46. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2000;21(2):115-37.
47. Pacifici R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 1996;11(8):1043-51.
48. Zheng SX, Vrindts Y, Lopez M, De Groote D, Zangerle PF, Collette J, et al. Increase in cytokine production (IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha but not IFN-gamma, GM-CSF or LIF) by stimulated whole blood cells in postmenopausal osteoporosis. *Maturitas*. 1997;26(1):63-71.
49. Yamashita J, McCauley LK. Antiresorptives and osteonecrosis of the jaw. *J Evid Based Dent Pract*. 2012;12(3 Suppl):233-47.
50. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002;288(3):321-33.
51. Zebaze RM, Libanati C, Austin M, Ghasem-Zadeh A, Hanley DA, Zanchetta JR, et al. Differing effects of denosumab and alendronate on cortical and trabecular bone. *Bone*. 2014;59:173-9.
52. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev*. 1998;19(1):80-100.
53. Brozoski MA, Traina AA, Deboni MC, Marques MM, Naclério-Homem MaG. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Rev Bras Reumatol*. 2012;52(2):265-70.
54. Uyanne J, Calhoun CC, Le AD. Antiresorptive drug-related osteonecrosis of the jaw. *Dent Clin North Am*. 2014;58(2):369-84.
55. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(9):1032-45.
56. Hodsman A, Adachi J, Olszynski W. Prevention and management of osteoporosis: consensus statements from the Scientific Advisory Board of the Osteoporosis Society of Canada. 6. Use of bisphosphonates in the treatment of osteoporosis. *CMAJ*. 1996;155(7):945-8.

57. Ruggiero SL, Woo SB. Biophosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Dent Clin North Am.* 2008;52(1):111-28, ix.
58. Weinstein RS, Roberson PK, Manolagas SC. Giant osteoclast formation and long-term oral bisphosphonate therapy. *N Engl J Med.* 2009;360(1):53-62.
59. Briner WW, Francis MD, Widder JS. The control of dental calculus in experimental animals. *Int Dent J.* 1971;21(1):61-72.
60. Urano T, Shiraki M, Kuroda T, Tanaka S, Uenishi K, Inoue S. Preventive effects of raloxifene treatment on age-related weight loss in postmenopausal women. *J Bone Miner Metab.* 2016.
61. Naylor KE, Jacques RM, Peel NF, Gossiel F, Eastell R. Response of bone turnover markers to raloxifene treatment in postmenopausal women with osteopenia. *Osteoporos Int.* 2016;27(8):2585-92.
62. Chesnut CH, Azria M, Silverman S, Engelhardt M, Olson M, Mindeholm L. Salmon calcitonin: a review of current and future therapeutic indications. *Osteoporos Int.* 2008;19(4):479-91.
63. Rizzoli R, Sigaud A, Azria M, Herrmann FR. Nasal salmon calcitonin blunts bone microstructure alterations in healthy postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2015;26(1):383-93.
64. Epstein MS, Ephros HD, Epstein JB. Review of current literature and implications of RANKL inhibitors for oral health care providers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013;116(6):e437-42.
65. Cummings SR, San Martin J, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, et al. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med.* 2009;361(8):756-65.
66. Narayanan P. Denosumab: A comprehensive review. *South Asian J Cancer.* 2013;2(4):272-7.
67. Kostenuik PJ, Nguyen HQ, McCabe J, Warmington KS, Kurahara C, Sun N, et al. Denosumab, a fully human monoclonal antibody to RANKL, inhibits bone resorption and increases BMD in knock-in mice that express chimeric (murine/human) RANKL. *J Bone Miner Res.* 2009;24(2):182-95.
68. Festuccia F, Jafari MT, Moioli A, Fofi C, Barberi S, Amendola S, et al. Safety and efficacy of denosumab in osteoporotic hemodialysed patients. *J Nephrol.* 2016.
69. Farrier AJ, Sanchez Franco LC, Shoaib A, Gulati V, Johnson N, Uzoigwe CE, et al. New anti-resorptives and antibody mediated anti-resorptive therapy. *Bone Joint J.* 2016;98-B(2):160-5.
70. Pageau SC. Denosumab. *MAbs.* 2009;1(3):210-5.

71. Reid IR, Miller PD, Brown JP, Kendler DL, Fahrleitner-Pammer A, Valter I, et al. Effects of denosumab on bone histomorphometry: the FREEDOM and STAND studies. *J Bone Miner Res.* 2010;25(10):2256-65.
72. Dahiya N, Khadka A, Sharma AK, Gupta AK, Singh N, Brashier DB. Denosumab: A bone antiresorptive drug. *Med J Armed Forces India.* 2015;71(1):71-5.
73. Matsushita Y, Hayashida S, Morishita K, Sakamoto H, Naruse T, Sakamoto Y, et al. Denosumab-associated osteonecrosis of the jaw affects osteoclast formation and differentiation: Pathological features of two cases. *Mol Clin Oncol.* 2016;4(2):191-4.
74. Hanley DA, Adachi JD, Bell A, Brown V. Denosumab: mechanism of action and clinical outcomes. *Int J Clin Pract.* 2012;66(12):1139-46.
75. Pierroz DD, Bonnet N, Baldock PA, Ominsky MS, Stolina M, Kostenuik PJ, et al. Are osteoclasts needed for the bone anabolic response to parathyroid hormone? A study of intermittent parathyroid hormone with denosumab or alendronate in knock-in mice expressing humanized RANKL. *J Biol Chem.* 2010;285(36):28164-73.
76. Ristow O, Gerngroß C, Schwaiger M, Hohlweg-Majert B, Kehl V, Jansen H, et al. Effect of antiresorptive drugs on bony turnover in the jaw: denosumab compared with bisphosphonates. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2014;52(4):308-13.
77. Peddi P, Lopez-Olivo MA, Pratt GF, Suarez-Almazor ME. Denosumab in patients with cancer and skeletal metastases: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev.* 2013;39(1):97-104.
78. Laskowski LK, Goldfarb DS, Howland MA, Kavcsak K, Lugassy DM, Smith SW. A RANKL Wrinkle: Denosumab-Induced Hypocalcemia. *J Med Toxicol.* 2016.
79. Pichardo SE, van Merkesteyn JP. Evaluation of a surgical treatment of denosumab-related osteonecrosis of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2016;122(3):272-8.
80. Henry DH, Costa L, Goldwasser F, Hirsh V, Hungria V, Prausova J, et al. Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastases in patients with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2011;29(9):1125-32.
81. Bouquot JE, McMahon RE. Neuropathic pain in maxillofacial osteonecrosis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000;58(9):1003-20.
82. Reuther T, Schuster T, Mende U, Kübler A. Osteoradionecrosis of the jaws as a side effect of radiotherapy of head and neck tumour patients--a report of a thirty year retrospective review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2003;32(3):289-95.
83. Taylor KH, Middlefell LS, Mizen KD. Osteonecrosis of the jaws induced by anti-RANK ligand therapy. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2010;48(3):221-3.

84. 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 jaw - 2009 update. *Aust Endod J*. 2009;35(3):119-30.
85. 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(10):1938-56.
86. Ravosa MJ, Ning J, Liu Y, Stack MS. Bisphosphonate effects on the behaviour of oral epithelial cells and oral fibroblasts. *Arch Oral Biol*. 2011;56(5):491-8.
87. 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.
88. Otto S, Hafner S, Grötz KA. The role of inferior alveolar nerve involvement in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67(3):589-92.
89. Ferlito S, Puzzo S, Liardo C. Preventive protocol for tooth extractions in patients treated with zoledronate: a case series. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011;69(6):e1-4.
90. Phal PM, Myall RW, Assael LA, Weissman JL. Imaging findings of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2007;28(6):1139-45.
91. Mawardi H, Giro G, Kajiya M, Ohta K, Almazrooa S, Alshwaimi E, et al. A role of oral bacteria in bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *J Dent Res*. 2011;90(11):1339-45.
92. 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.
93. Sivoilella S, Lumachi F, Stellini E, Favero L. Denosumab and anti-angiogenetic drug-related osteonecrosis of the jaw: an uncommon but potentially severe disease. *Anticancer Res*. 2013;33(5):1793-7.
94. Pazianas M. Osteonecrosis of the jaw and the role of macrophages. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(3):232-40.
95. Katsarelis H, Shah NP, Dhariwal DK, Pazianas M. Infection and medication-related osteonecrosis of the jaw. *J Dent Res*. 2015;94(4):534-9.
96. Hoefert S, Schmitz I, Weichert F, Gaspar M, Eufinger H. Macrophages and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): evidence of local

immunosuppression of macrophages in contrast to other infectious jaw diseases. *Clin Oral Investig*. 2015;19(2):497-508.

97. Van den Wyngaert T, Wouters K, Huizing MT, Vermorken JB. RANK ligand inhibition in bone metastatic cancer and risk of osteonecrosis of the jaw (ONJ): non bis in idem? *Support Care Cancer*. 2011;19(12):2035-40.

98. Abtahi J, Agholme F, Sandberg O, Aspenberg P. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw in a rat model arises first after the bone has become exposed. No primary necrosis in unexposed bone. *J Oral Pathol Med*. 2012;41(6):494-9.

99. Bamias A, Kastiritis E, Bamia C, Mouloupoulos 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.

100. Advisory Task Force on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws AeAoOaMS. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007;65(3):369-76.

101. Badros A, Weikel D, Salama A, Goloubeva O, Schneider A, Rapoport A, et al. Osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma patients: clinical features and risk factors. *J Clin Oncol*. 2006;24(6):945-52.

102. Ruggiero SL, Fantasia J, Carlson E. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;102(4):433-41.

103. 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.

104. Dimopoulos MA, Kastiritis E, Bamia C, Melakopoulos I, Gika D, Roussou M, et al. Reduction of osteonecrosis of the jaw (ONJ) after implementation of preventive measures in patients with multiple myeloma treated with zoledronic acid. *Ann Oncol*. 2009;20(1):117-20.

105. Russmueller G, Seemann R, Weiss K, Stadler V, Speiss M, Perisanidis C, et al. The association of medication-related osteonecrosis of the jaw with *Actinomyces* spp. infection. *Sci Rep*. 2016;6:31604.

106. Affairs ADACoS. Dental management of patients receiving oral bisphosphonate therapy: expert panel recommendations. *J Am Dent Assoc*. 2006;137(8):1144-50.

107. López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Martínez-Canovas A, Molina-Miñano F, Gómez-García F, Vicente-Ortega V. Perioperative antibiotic regimen in rats treated with pamidronate plus dexamethasone and subjected to dental extraction: a study of the changes in the jaws. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011;69(10):2488-93.

108. Scoletta M, Arata V, Arduino PG, Lerda E, Chiecchio A, Gallesio G, et al. Tooth extractions in intravenous bisphosphonate-treated patients: a refined protocol. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71(6):994-9.
109. Magopoulos C, Karakinaris G, Telioudis Z, Vahtsevanos K, Dimitrakopoulos I, Antoniadis K, et al. Osteonecrosis of the jaws due to bisphosphonate use. A review of 60 cases and treatment proposals. *Am J Otolaryngol.* 2007;28(3):158-63.
110. Minamisako MC, Ribeiro GH, Lisboa ML, Mariela Rodríguez Cordeiro M, Grando LJ. Medication-Related Osteonecrosis of Jaws: A Low-Level Laser Therapy and Antimicrobial Photodynamic Therapy Case Approach. *Case Rep Dent.* 2016;2016:6267406.
111. Tschon M, Incerti-Parenti S, Cepollaro S, Checchi L, Fini M. Photobiomodulation with low-level diode laser promotes osteoblast migration in an in vitro micro wound model. *J Biomed Opt.* 2015;20(7):78002.
112. Latifyan S, Genot MT, Klastersky J. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a review of the potential efficacy of low-level laser therapy. *Support Care Cancer.* 2016;24(9):3687-93.
113. Reddy GK. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. *J Clin Laser Med Surg.* 2004;22(2):141-50.
114. Vescovi P, Merigo E, Meleti M, Fornaini C, Nammour S, Manfredi M. Nd:YAG laser biostimulation of bisphosphonate-associated necrosis of the jawbone with and without surgical treatment. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2007;45(8):628-32.
115. Núñez S, Ribeiro MS, Garcez AS. PDT terapia fotodinâmica antimicrobiana na odontologia: Editora Elsevier Ltda; 2013.
116. Modica-Napolitano JS, Joyal JL, Ara G, Oseroff AR, Aprille JR. Mitochondrial toxicity of cationic photosensitizers for photochemotherapy. *Cancer Res.* 1990;50(24):7876-81.
117. 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.
118. Naik NH, Russo TA. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: the role of actinomyces. *Clin Infect Dis.* 2009;49(11):1729-32.
119. Otto S, Hafner S, Mast G, Tischer T, Volkmer E, Schieker M, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: is pH the missing part in the pathogenesis puzzle? *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(5):1158-61.
120. Lumerman HS. Exposed bone in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws may be induced and maintained by localized microbial biofilm osteomyelitis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71(12):2011.

121. Rosa LP, da Silva FC, Nader SA, Meira GA, Viana MS. Antimicrobial photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* biofilms in bone specimens using methylene blue, toluidine blue ortho and malachite green: An in vitro study. *Arch Oral Biol*. 2015;60(5):675-80.
122. Bisland SK, Chien C, Wilson BC, Burch S. Pre-clinical in vitro and in vivo studies to examine the potential use of photodynamic therapy in the treatment of osteomyelitis. *Photochem Photobiol Sci*. 2006;5(1):31-8.
123. 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.
124. Ristow O, Otto S, Troeltzsch M, Hohlweg-Majert B, Pautke C. Treatment perspectives for medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). *J Craniomaxillofac Surg*. 2015;43(2):290-3.
125. Ruano R, Jaeger RG, Jaeger MM. Effect of a ceramic and a non-ceramic hydroxyapatite on cell growth and procollagen synthesis of cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontol*. 2000;71(4):540-5.
126. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*. 2007;2(2):329-33.
127. Correia VeF, Caldeira CL, Marques MM. Cytotoxicity evaluation of sodium alendronate on cultured human periodontal ligament fibroblasts. *Dent Traumatol*. 2006;22(6):312-7.
128. Brozoski MA. Efeito de diferentes concentrações do alendronato sódico sobre a viabilidade e proliferação de diferentes tipos celulares em cultura. [dissertação] São Paulo: Universidade de São Paulo; Faculdade de Odontologia 2011.
129. Açıl Y, Möller B, Niehoff P, Rachko K, Gassling V, Wiltfang J, et al. The cytotoxic effects of three different bisphosphonates in-vitro on human gingival fibroblasts, osteoblasts and osteogenic sarcoma cells. *J Craniomaxillofac Surg*. 2012;40(8):e229-35.
130. McLeod NM, Moutasim KA, Brennan PA, Thomas G, Jenei V. In vitro effect of bisphosphonates on oral keratinocytes and fibroblasts. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014;72(3):503-9.
131. Zwolak P, Dudek AZ. Antineoplastic activity of zoledronic acid and denosumab. *Anticancer Res*. 2013;33(8):2981-8.
132. Misso G, Porru M, Stoppacciaro A, Castellano M, De Cicco F, Leonetti C, et al. Evaluation of the in vitro and in vivo antiangiogenic effects of denosumab and zoledronic acid. *Cancer Biol Ther*. 2012;13(14):1491-500.

133. Kuroshima S, Al-Salihi Z, Yamashita J. Mouse anti-RANKL antibody delays oral wound healing and increases TRAP-positive mononuclear cells in bone marrow. *Clin Oral Investig*. 2016;20(4):727-36.
134. Hagelauer N, Ziebart T, Pabst AM, Walter C. Bisphosphonates inhibit cell functions of HUVECs, fibroblasts and osteogenic cells via inhibition of protein geranylgeranylation. *Clin Oral Investig*. 2015;19(5):1079-91.
135. Cozin M, Pinker BM, Solemani K, Zuniga JM, Dadaian SC, Cremers S, et al. Novel therapy to reverse the cellular effects of bisphosphonates on primary human oral fibroblasts. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011;69(10):2564-78.
136. Lipton A, Fizazi K, Stopeck AT, Henry DH, Brown JE, Yardley DA, et al. Superiority of denosumab to zoledronic acid for prevention of skeletal-related events: a combined analysis of 3 pivotal, randomised, phase 3 trials. *Eur J Cancer*. 2012;48(16):3082-92.
137. Seeman E, Delmas PD, Hanley DA, Sellmeyer D, Cheung AM, Shane E, et al. Microarchitectural deterioration of cortical and trabecular bone: differing effects of denosumab and alendronate. *J Bone Miner Res*. 2010;25(8):1886-94.
138. Scheper MA, Badros A, Chaisuparat R, Cullen KJ, Meiller TF. Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Br J Haematol*. 2009;144(5):667-76.
139. Soydan SS, Araz K, Senel FV, Yurtcu E, Helvacioğlu F, Dagdeviren A, et al. Effects of alendronate and pamidronate on apoptosis and cell proliferation in cultured primary human gingival fibroblasts. *Hum Exp Toxicol*. 2015;34(11):1073-82.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Efeito de diferentes concentrações do Denosumab sobre a viabilidade, proliferação e migração de fibroblastos em cultura.

Pesquisador: Natalia Caroline Aguiar Tartaroli

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46657715.5.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.824.898

Apresentação do Projeto:

O projeto trata de avaliar o efeito de diferentes concentrações do denosumab sobre a viabilidade, proliferação e migração de fibroblastos em cultura.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar comparativamente a viabilidade, a proliferação e a migração de fibroblastos em cultura, submetidos a diferentes concentrações de denosumab utilizando a análise de viabilidade celular medida pela atividade mitocondrial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A metodologia da pesquisa e o material envolvido apresentam um risco mínimo, inerentes ao procedimentos metodológicos e os benefícios serão de conhecer o efeito do denosumab e como sua toxicidade pode inviabilizar a proliferação celular.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma emenda. Justificativa da Emenda: Após recorrer à literatura foi observado que já existe artigos publicados que utilizam endoteliócitos e que a droga estudada não possui efeito sobre os mesmos. Assim determinou-se apenas os fibroblastos como objeto de pesquisa e adicionou-se mais um teste.

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes 2227		CEP: 05.508-900
Bairro: Cidade Universitária		
UF: SP	Município: SÃO PAULO	
Telefone: (11) 3091-7900	Fax: (11) 3091-7814	E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.167.916

proliferação de fibroblastos, em cultura celular, medida pela atividade mitocondrial.

Protocolo de pesquisa adequado e contempla adequadamente os aspectos éticos envolvidos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados: Projeto Detalhado, Folha de Rosto e Autorização do Laboratório de Cultura de Células da FOUSP.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 03 de Agosto de 2015

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Blazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br