MARIANA APARECIDA BROZOSKI

**Efeito de diferentes concentrações do alendronato sódico
sobre a viabilidade e proliferação de diferentes
tipos celulares em cultura**

São Paulo

2011

MARIANA APARECIDA BROZOSKI

**Efeito de diferentes concentrações do alendronato sódico
sobre a viabilidade e proliferação de diferentes
tipos celulares em cultura**

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Cirurgia
e Traumatologia Buco Maxilo
Faciais

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

São Paulo

2011

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

Brozoski, Mariana Aparecida

Efeito de diferentes concentrações do alendronato sódico sobre a viabilidade e proliferação de diferentes tipos celulares em cultura [versão corrigida] / Mariana Aparecida Brozoski; orientador Maria da Graça Naclério-Homem. -- São Paulo, 2011.

73p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Dissertação -- 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 de acordo com sugestões da Banca Examinadora em 28/04/2011

1. Alendronato sódico – Células do tecido conjuntivo – Cultura – Efeitos. 2. Cirurgia Bucomaxilofaciais. I. Naclério-Homem, Maria da Graça. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Brozoski MA. Efeito de diferentes concentrações do alendronato sódico sobre a viabilidade e proliferação de diferentes tipos celulares em cultura Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: ____/____/2011

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **João e Terezinha**, por estarem sempre presentes em todos os momentos, apoiando, incentivando e por não me deixarem desistir nunca. Vocês são exemplos de fé, amor e família. Saber que vocês estão sempre ao meu lado me dá força e coragem para buscar o que eu desejo, pois sei que com o apoio de vocês nada é impossível. Obrigada por permitirem que mais um sonho de minha vida se tornasse realidade.

Ao meu irmão **Ivan**, por estar sempre ao meu lado, junto com o papai e a mamãe você forma o alicerce que sustenta minha vida e que se chama família.

Ao **Bonner**, a coisinha mais linda do mundo, por me receber sempre com alegria quando chego em casa, pelo carinho e amor incondicionais que só uma criatura tão pura e doce pode dar.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a **Deus**, por sua constante proteção, guiando e iluminando sempre meus passos. Somente o Senhor sabe tudo que se passa em minha vida, me sustenta nos momentos incertos, me fortalece, me encoraja a seguir. Sei que ao seu lado tudo posso.

Agradeço a todos os santos que intercedem a Deus por mim em especial a **Santa Rita de Cássia** a quem recorro constantemente e nunca me abandona.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora **Professora Dra. Maria da Graça Naclério-Homem**, muito obrigada pela atenção e carinho com que a senhora me orienta. Obrigada por ter acreditado em mim, pelo incentivo e pelas oportunidades que me proporciona. A senhora é um exemplo de mestre que estimula e incentiva levando seus orientados ao crescimento. Seus conselhos profissionais e pessoais foram muito importantes para meu amadurecimento neste período.

A **Professora Dra. Márcia Martins Marques**, não tenho palavras para agradecer à senhora. Quando tudo parecia impossível a senhora abriu as portas do seu laboratório e, com todo o carinho, dedicação e profissionalismo me acolheu permitindo a realização desse trabalho. De um modo único é capaz de incentivar a todos que estão ao seu lado. Obrigada por estar sempre disponível. Esses meses que passei no seu laboratório me permitiram conhecer o que é um pesquisador, e me incentivaram a continuar nesse caminho.

A **Professora Dra. Maria Cristina Zindel Deboni. Cris**, você foi a primeira a me receber na disciplina quando vim para fazer estágio, desde então esteve sempre presente em todos os meus trabalhos. Muito obrigada pela disposição e atenção com que você sempre me orientou, por acreditar em mim. Levarei para sempre comigo a eficiência e determinação com que você trilha sua vida acadêmica.

A **Dra. Vera Pozzani**. A senhora é uma grande amiga, conselheira, atenciosa e carinhosa sempre. Obrigada pelos momentos compartilhados.

A **Professora Dra. Marina Cleia Palo Prado**, obrigada, pela confiança e incentivo que a senhora depositou em mim na clínica de graduação, me ajudando a ter confiança para “orientar” aos alunos.

Aos professores da Disciplina de Cirurgia Odontológica e Buco Maxilo Facial, **Prof. Dr. Antonio Carlos de Campos, Profa. Dra. Andréia Aparecida Traina, Prof. Dr. Fernando Melhem Elias, Prof. Dr. José Luiz Piratininga, Prof. Dr. Marcos Vianna Gayotto**, muito obrigada pelos ensinamentos transmitidos durante o curso de pós graduação.

Ao **Rafael Salla Paulilo**, obrigada pelo carinho e companheirismo, pelo incentivo incondicional a minha vida e minha carreira. Obrigada por entender que “as células precisavam se alimentar”. Ao seu lado tudo se torna mais fácil.

Aos amigos da pós-graduação **Alexandre Viana Monteiro Frascino, Gabriel Denner Campolongo, Leandro Botelho Hanna, Maria Del Pilar Rodriguez Sanchez, Ophir Ribeiro Júnior, Rodrigo Foronda** e **Samantha Cristine Santos Xisto Braga Cavalcanti**, foi muito bom dividir com vocês estes dois anos de pós, desejo a todos muito sucesso.

Ao **Nilton Azambuja Junior** por ter me ajudado na confecção desse trabalho, muitas vezes deixando seu trabalho de lado para colaborar com o meu, por ter acreditado que daria tempo e daria certo. Muito obrigada.

Aos meus novos amigos do laboratório de cultivo celular **Cacio de Moura Netto, Fernando, Maria Fernanda de Souza Setúbal Destro** e a minha antiga amiga **Sueli Patrícia Harumi Miyagi**. Obrigada pela paciência e ajuda no laboratório.

Ao **Dr. Luciano Ferreira Carvalho Filho**, por ter aberto as portas de seu serviço e me incentivado sempre a crescer na Cirurgia Bucomaxilofacial, mais do que um chefe você é um amigo, e o apoio que você e **Eliana** me deram nesses anos foi fundamental, muito obrigada.

As funcionárias da disciplina de **Cirurgia Aparecida Conceição de Sousa** e **Natália Conceição Afonso**, muito obrigada meninas, pela ajuda nas clínicas de pós-graduação e fora dela também.

Aos secretários do Departamento **Ângela de Andrade, Edison Henrique Vicente, Roseli de Andrade** e **Belira de Carvalho**, vocês sempre me orientaram quando estava mais desorientada com tanto papel e tanta coisa para preencher e querendo tudo para ontem! Muito obrigada.

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

Aos **alunos da graduação** por permitirem iniciar meus primeiros passos na vida acadêmica.

Às funcionárias da pós graduação **Alessandra Moreira de Lima, Cátia Tiezzi dos Santos** e **Donata Moreira**, muito obrigada pela paciência e dedicação nesse período.

Ao **Serviço de Biblioteca**, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo pela revisão deste trabalho, em especial a **Glauci Elaine Damasio Fidelis**, por ter me atendido

prontamente com tanto carinho e atenção permitindo que tudo desse tempo.

Ao **Sr. Cosmo Donato**, que enfrentando osteonecrose em maxila induzida por bisfosfonato confiou e acreditou no tratamento por nós proposto, me incentivou muito a seguir pesquisando esse tema. A alegria do senhor a cada clínica observando a melhora dos sintomas me faz ter a certeza que estudar e pesquisar vale à pena.

A **Faculdade de Odontologia** e a **Universidade de São Paulo**, por fornecerem infra-estrutura para realização da pós-graduação.

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

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

RESUMO

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.

Os bisfosfonatos têm sido indicados para o tratamento de doenças ósseas líticas. Atualmente, seu emprego terapêutico aumentou e com ele os efeitos adversos, sendo um dos mais importante a indução da osteonecrose dos maxilares, uma complicação de difícil tratamento e solução. Até o presente, não se sabe ao certo qual o mecanismo de desenvolvimento da osteonecrose e nem qual deve ser o melhor tratamento estabelecido perante essa manifestação. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do alendronato sódico sobre a viabilidade e proliferação de osteoblastos e fibroblastos em cultura. Foram utilizados osteoblastos-símile linhagem OSTEOP 1 e fibroblastos de mucosa bucal humana linhagem FMM1. Após serem submetidos aos testes de citotoxicidade com concentrações do alendronato sódico variando de $10^{-2}M$ a $10^{-8}M$ os fibroblastos apresentaram diminuição significativa de viabilidade celular apenas na concentração de $10^{-2}M$ ($p < 0,01$). Os osteoblastos demonstraram viabilidade celular no grupo controle significativamente maior que todos os demais grupos; o grupo tratado com o alendronato na concentração de $10^{-4}M$ apresentou viabilidade celular semelhante a de todos os grupos, exceto o grupo de concentração $10^{-2}M$ e a viabilidade celular dos demais grupos foi semelhante entre si ($p < 0,01$). As concentrações de alendronato sódico superiores a $10^{-5}M$ impediram a proliferação dos osteoblastos. Foi possível concluir que o alendronato sódico é citotóxico para células osteoblastos-símile e fibroblastos em cultura em função de sua concentração.

Os fibroblastos são menos sensíveis a concentrações maiores de alendronato sódico que os osteoblastos.

Palavras-Chave: Osteonecrose, Alendronato, Maxila, Mandíbula.

ABSTRACT

Brozoski MA. Effect of different concentrations of alendronate on the viability and proliferation of different cell types [dissertation] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011.

Bisphosphonates have been therapeutically used for the management of lytic bone diseases. Their use has been increased nowadays and besides that associated adverse effects have been amplified. Jaw osteonecrosis induced by this drug is perhaps the most important complication because of the great morbidity and difficulty to deal with. Until now the physiopathology of osteonecrosis remains unclear and the treatment that should be established is uncertain. This study aimed to evaluate the effect of sodium alendronate a bisphosphonate used for the treatment of osteoporosis on the viability and proliferation of osteoblasts and fibroblasts in culture. Osteoblast-simile from the lineage OSTEO1 and a human oral mucosa fibroblasts from the lineage FMM1 were used. After being subjected to tests with concentrations of sodic alendronate ranging from 10^{-8}M to 10^{-2}M fibroblasts showed a significant decrease in cell viability at the concentration of 10^{-2}M ($p < 0.01$). Osteoblasts showed that the cell viability in the control group was significantly higher than all other groups, the group treated with alendronate at a concentration of 10^{-4}M had similar cell viability with all groups except the group of 10^{-2}M concentration and the cell viability of other groups was similar between groups ($p < 0.01$). The concentrations of alendronate greater than 10^{-5}M prevented the proliferation of osteoblasts. It was possible to conclude that alendronate is cytotoxic to osteoblast-símile cells and fibroblasts in culture due to its concentration. The fibroblasts are less sensitive to higher concentrations of alendronate than osteoblasts.

Keywords: Osteonecrosis, Alendronate, Jaws.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - Estrutura química dos BFs comparados aos pirofosfatos-	23
Figura 2.2 – Efeito indireto dos BFs sobre os osteoclastos, mediado por osteoblastos -	24
Figura 2.3 – Ilustração esquemática acúmulo BF no osso -	27
Figura 4.1 – Fotomicrografia células em subconfluência: a Linhagem FMM1 – Aumento 10 vezes. b – Linhagem Osteo 1 em aumento 10 vezes -	45
Figura 4.2 – Estrutura química alendronato sódico -	46
Figura 4.3 – Fotografia ilustrando o plaqueamento com pipetador multicanal -	49
Figura 4.4 – Esquema de plaqueamento em placa de 96 poços demonstrando distribuição dos grupos experimentais -	50
Gráfico 5.1 – Viabilidade Celular média da linhagem FMM1 em resposta a diferentes concentrações de alendronato sódico. * Resultado significativamente menor que o do controle ($p<0,01$). Barras representam o erro da média-	53
Gráfico 5.2 – Viabilidade Celular média da linhagem OSTEO1 em resposta a diferentes concentrações de alendronato sódico. * Controle significativamente maior que os demais grupos. Δ igual a todos os grupos exceto ao grupo de concentração 10^{-2} M. ($p<0,01$). As barras indicam os erros da média-	54

Gráfico 5.3 - Curva de Crescimento Celular da linhagem OSTEO 1 – submetidas a diferentes concentrações de alendronato sódico. * número de células viáveis, significantemente maior que as células do mesmo grupo experimental no tempo zero (crescimento significativo $p < 0,01$). Os dados são média e as barras o erro padrão da média-.....55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Histórico	18
2.2 Conceitos	20
2.3 Uso terapêutico dos bisfosfonatos	21
2.4 Mecanismo de ação dos bisfosfonatos	23
2.5 Etiopatogenia	26
2.6 Diagnóstico e características clínicas	29
2.7 Tratamento	31
2.8 Implantes dentários em pacientes em uso de bisfosfonatos	37
2.9 Estudos experimentais	40
3 PROPOSIÇÃO	43
4 METODOLOGIA.....	44
4.1 Linhagem celular	44
4.2 Cultivo celular	44
4.3 Substância testada	46
4.4 Grupos experimentais	47
4.5 Experimento	48
4.5.1 Viabilidade celular	49
4.5.2 Proliferação celular	50
4.6 Análise estatística	52
5. RESULTADOS.....	53
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS	62
APÊNDICE	
ANEXO	

1 INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos (BFs) vêm sendo utilizados desde 1960, para o tratamento de metástases ósseas, câncer de pulmão, mieloma múltiplo, doença de Paget, controle do metabolismo do cálcio entre outros (1, 2). Atualmente, seu emprego terapêutico tem aumentado principalmente para o tratamento e prevenção de osteoporose e osteopenia. Estima-se que no período de maio de 2003 a abril de 2004 foram realizadas aproximadamente 22 milhões de prescrições de alendronato sódico nos Estados Unidos da América (1). Os BFs são os fármacos mais prescritos para o tratamento da osteoporose no mundo (1).

Sabe-se que os BFs atuam alterando o mecanismo de reabsorção e remodelação óssea, os quais são fundamentais para a manutenção da homeostasia do tecido ósseo (2).

Com o aumento da utilização dos BFs e do tempo no qual os pacientes fazem uso desses medicamentos, ocorreram os primeiros relatos de complicações associadas ao seu uso sendo as mais comuns a mialgia e a esofagite (3, 4). Em 2003, foi descrito o primeiro caso de osteonecrose em maxila relacionado ao uso de BFs (5). A osteonecrose dos maxilares associada ao uso dos BFs (ONMB) passou a representar impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes que utilizam esse fármaco (5).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

A primeira descrição da síntese e utilização de BFs foi realizada no setor industrial, na Alemanha, em 1865, utilizado em indústrias, principalmente, como inibidor da corrosão ou como agente químico para produção têxtil ou de fertilizantes. Apenas a partir dos anos 1960, é que os BFs foram desenvolvidos e utilizados como fármaco para o tratamento de diversas doenças dos ossos e metabolismo do cálcio (2)

De 1858 a 1906, com o desenvolvimento da indústria do fósforo para uso doméstico, com combustão pelo atrito em qualquer superfície (*strike-anywhere*), surgiram descrições de casos de osteonecrose maxilares nos trabalhadores dessas empresas. Esse período foi descrito como uma epidemia denominada de *Phossy-Jaw*. (2). Essa pode ser considerada como uma epidemia semelhante de ONMB (6).

Em 1969, foi sintetizado o Etidronato, primeiro BF utilizado para o tratamento de doenças em humanos (2).

O Food and Drugs Administration (FDA) americano aprova o uso de pamidronato para o tratamento de hipercalcêmica de malignidade em 1991. Em 1995, aprova o uso do pamidronato para o tratamento do mieloma múltiplo. Em 2001, o FDA aprova o uso do zoledronato (1).

O primeiro relato de caso associando o uso de BF e o aparecimento de osteonecrose dos maxilares foi realizado por Marx em 2003, quando documentou 36 lesões ósseas em mandíbula e/ou maxila em pacientes que faziam uso de pamidronato ou zoledronato, citando a lesão como sendo um efeito adverso severo desconhecido (5).

A partir de então, diversos trabalhos foram publicados com relato de casos de ONMB. Em 2004, Ruggiero et al. apresentaram um trabalho com uma revisão de 63 casos de ONMB (7).

Com o aumento dos casos de ONMB, em 2004, a Novartis Fabricante dos BFs alendronato (Fosamax[®]), pamidronato (Aredia[®]) e zoledronato (Zometa[®]) incluíram na bula dos medicamentos a possibilidade de ocorrência de ONMB (8).

Em 2005, Migliorati et al. publicaram um protocolo para o tratamento dos pacientes portadores de ONMB, ressaltando a importância do conhecimento e tratamento da doença (9).

Em 2006, a American Dental Association (ADA) publicou recomendações para o tratamento odontológico de pacientes recebendo BFs (1). A American Association of Oral Maxillofacial Surgeons (AAOMS) em 2007, publicou trabalho reunindo diversos autores onde discutem a ONMB, esse trabalho foi atualizado em 2009 (10, 11).

Em 2008, Grant et al. publicam revisão de 115 casos de pacientes em uso de BFs submetidos a implantes dentários (12).

2.2 Conceitos

A ONMB foi definida pela AAOMS, em 2007, como uma área de exposição óssea na maxila ou mandíbula que não se repara em oito semanas acometendo pacientes que estejam recebendo ou que receberam BF sistemicamente e não receberam radioterapia na maxila ou mandíbula (10).

2.3 Uso terapêutico dos bisfosfonatos

Os BFs são indicados principalmente para o tratamento de osteopenia, osteoporose, doença de Paget, metástases ósseas, hipercalcemia de doenças malignas, mieloma múltiplo, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de pulmão, câncer renal, osteogênese imperfeita, controle do metabolismo do cálcio (7, 10, 12-18).

A Sociedade Americana de Oncologia considera que os BFs devem ser o tratamento de escolha para hipercalcemia, moderada a severa associada à malignidade e lesões osteolíticas metastáticas associadas a câncer de mama e mieloma múltiplo em conjunto com agentes quimioterápicos antineoplásicos (3, 19)

Os BFs também são indicados para o tratamento de lesões líticas oriundas de qualquer tumor sólido (7).

Em estudo realizado em 2003, por Cheng et al., observaram as alterações citoquímicas e estruturais nos osteoclastos de lesões centrais de células gigantes tratadas com BFs. Encontraram apoptoses das células osteoclásticas nos casos tratados com pamidronato, e mudanças ultraestruturais no citoplasma e núcleo dessas células. Consideraram que os BFs podem ser úteis como adjuvante contra os efeitos da reabsorção óssea nas lesões centrais de células gigantes (20).

Embora os BFs não aumentem a sobrevida das pessoas com câncer, proporcionam impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes com a doença em estado avançado quando ocorre envolvimento o sistema esquelético (10).

King e Umland, em 2008, descreveram as indicações e dose dos principais BFs utilizados nos Estados Unidos. Os mais utilizados eram os compostos nitrogenados, como alendronato, risedronato, ibandronato, pamidronato, zoledronato. Com relação a

potência das drogas, referiram que o zoledronato é 10.000 vezes mais potente que o Alendronato (17).

2.4 Mecanismo de ação dos bisfosfonatos

Os BFs são análogos não metabolizáveis dos pirofosfatos inorgânicos utilizados na indústria em creme dentais para inibição da formação de cálculo por meio da inibição da precipitação do cálcio (2, 7).

Ao contrário dos pirofosfatos, os BFs apresentam uma cadeia de carbono ao invés de uma molécula de oxigênio. A estrutura P-C-P, permite que ocorra uma ligação com os cristais de hidroxiapatita com alta afinidade, e a presença de nitrogênio em um dos lados dessa cadeia aumenta ainda mais o potencial farmacológico da droga (7)

A meia vida dos BFs é de aproximadamente 10 anos, e o seu uso prolongado resulta em um acúmulo substancial da droga no esqueleto (21).

A estrutura química, P-C-P permite um grande número de possibilidade de variações, tanto modificando as duas cadeias laterais no carbono, quanto adicionando um grupo éster ao fosfato. Cada BF apresenta sua própria característica química, fisicoquímica e biológica, o que implica que não é possível extrapolar os resultados de um composto para os outros com relação ao seu mecanismo de ação (2) (Figura 2.1).

Figura 2.1 – Estrutura química dos BFs comparados aos pirofosfatos. Adaptado de Fleisch, H. (1998). "Bisphosphonates: mechanisms of action." Endocr Rev 19(1): 80-100

Há dois efeitos biológicos fundamentais dos BFs: inibição da calcificação, quando administrado em altas doses, e inibição da reabsorção óssea (2). Eles atuam por meio de dois mecanismos de ação relacionados com atividade antiosteoclástica e antiangiogênica (22).

Os BFs alteram o mecanismo do tecido ósseo em vários níveis, inibindo a reabsorção óssea e diminuindo o *turnover* ósseo. Em nível celular, os BFs atuam sob os osteoblastos podendo inibir sua função pela diminuição de recrutamento de osteoclastos, de sua viabilidade ou da sua atividade óssea. Do ponto de vista molecular, postula-se que os BFs possam modular a função dos osteoclastos reagindo com um receptor de superfície ou com uma enzima intracelular (7) (Figura 2.2).

Figura 2.2 – Efeito indireto dos BFs sobre os osteoclastos, mediado por osteoblastos. Adaptado de Fleisch, H. (1998). "Bisphosphonates: mechanisms of action." Endocr Rev 19(1): 80-100.

Com relação a atividade de antirreabsorção, um dos fatores mais importantes do efeito dos BFs está na inibição da atividade osteoclástica, sendo que esta função demonstra uma das suas mais importantes aplicações clínicas, no tratamento da osteoporose e do câncer no sistema esquelético (2).

A diminuição do processo de reabsorção óssea pelos BFs é explicada considerando-se que os metabólitos dos compostos não

nitrogenados são tóxicos aos osteoclastos levando-os à morte. Já os compostos nitrogenados por sua vez, inibem a diferenciação dos osteoclastos e estimulam os osteoblastos a produzirem fator de inibição dos osteoclastos, com isso ocorre diminuição na reabsorção óssea. Como o processo de *turnover* ósseo está baseado nos processos de reabsorção e deposição, a remodelação óssea fica comprometida, contudo o osso continua a mineralizar e pode ficar frágil, quebradiço e menos elástico. Os autores descrevem ainda que os BFs apresentem atividade antiangiogênica e antitumoral (21).

2.5 Etiopatogenia

O mecanismo exato do desenvolvimento de ONMB não é conhecido. A hipótese mais aceita está baseada na supressão do *turnover* ósseo, associada às condições únicas que envolvem os ossos da maxila e mandíbula. Essas condições incluem o fato que os ossos estão separados da cavidade bucal por uma mucosa fina e delgada, sendo que essa barreira pode facilmente ser rompida por atividades fisiológicas como a mastigação (21).

O *turnover* ósseo na maxila e mandíbula, especialmente na região da crista alveolar foi descrito como sendo maior do que em outras partes do esqueleto (23).

A boca é colonizada por um grande número de bactérias e os ossos maxilares frequentemente apresentam-se envolvidos em processos sépticos de origem periodontal ou pulpar (10).

A biodisponibilidade dos BFs orais foi descrita entre 1% e 10%. Vinte a 80% do medicamento absorvido é rapidamente ligado aos ossos, em porcentagens maiores em locais onde está ocorrendo formação óssea (24), e porcentagens maiores ainda em locais de reabsorção óssea (25).

Quando ocorre um acúmulo de BF capaz de diminuir *turnover* ósseo a reparação por trauma induzido ou fisiológico não ocorre adequadamente, levando a formação de uma área com osso necrótico exposta ao meio oral (21).

São necessárias aproximadamente seis meses recebendo 1 dose mensal, ou seja, seis doses, de BF endovenoso para que o paciente apresente risco de desenvolver ONMB, enquanto que para os BFs administrados por via oral, como alendronato sódico (Fosamax®) são necessários três anos recebendo 1 dose semanal, ou seja, cento e cinquenta e seis doses. Essa diferença, segundo os autores, ocorre devido à baixa solubilidade lipídica dos BFs administrados por via oral, fazendo com que ocorra uma absorção

intestinal de apenas 0,63% da droga. Os BFs orais se acumulam lentamente nos ossos, e a exposição clínica do osso necrótico não acontece antes de três anos de administração do medicamento, tendo sua incidência e severidade aumentadas com cada ano adicional de uso (15, 26) (Figura 2.3).

Figura 2.3 – Ilustração esquemática acúmulo BF no osso. Adaptado de Marx, R. E. (2006). Oral & Intravenous Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaws: History, Etiology, Prevention, and Treatment, Quintessence Publishing

A atividade antiangiogênica foi observada nos compostos nitrogenados e diminui o nível do fator de crescimento endotelial, diminuindo assim, a vascularização óssea, o que contribuiu para a ONMB (27).

O uso concomitante de outros medicamentos, como corticosteróides e quimioterápicos, podem potencializar o risco de ONMB (12). O tempo de uso dos BFs, uso concomitante com estrógeno e idade superior a 65 anos também potencializam o risco de ONMB (1). Abud-Id et al., em 2008, em um estudo retrospectivo multicêntrico, determinaram que dos 78 pacientes estudados em 17 centros; a maioria dos pacientes fazia uso de BF por via endovenosa, para o tratamento de doença maligna, há mais

de um ano, e já tinham recebido tratamento prévio com quimioterapia ou esteróides (14).

A ONMB resulta de uma complexa interligação do metabolismo ósseo, onde um trauma local aumenta a demanda por reparação óssea, associado à infecção e hipovascularização (13).

2.6 Diagnóstico e características clínicas

O diagnóstico de ONMB é baseado na história e exame clínico do paciente. Pacientes podem apresentar exposição óssea necrótica, variando de poucos milímetros a áreas maiores, e permanecer assintomáticos por semanas, meses ou anos, porém 60% dos casos referem dor. A lesão frequentemente se torna sintomática quando ocorre inflamação ou infecção dos tecidos adjacentes (28).

Os primeiros sinais e sintomas descritos são: dor profunda no osso e mobilidade dental sem relação com doenças periodontais, traumas dentais ou outras doenças, aumento de volume, eritema, ulceração e fístula sinusal (15).

A ONMB apresenta maior incidência na mandíbula em comparação com a maxila em uma proporção de 2:1, e em áreas com mucosa menos espessa, como proeminências ósseas, tórus e linha milióidea. A quantidade de osso exposto varia, podendo ser pequena ou grande, começando com uma exposição pontual que pode permanecer assim ou progredir para uma exposição maior (15, 21, 29, 30).

Radiografias convencionais, bidimensionais, podem não revelar estágios iniciais de ONMB, demonstrando apenas alterações quando 30% a 50 % do osso já estiver desmineralizado (21). Radiograficamente é possível observar um espessamento da lâmina dura, e aumento do ligamento periodontal no osso alveolar no ponto de início da ONMB (15).

Em um estudo retrospectivo em 2005, Migliorati et al; descreveram uma revisão de dezoito casos de ONMB de pacientes que faziam o uso de pamidronato, ácido zoledronico ou alendronato. Apenas dois pacientes desenvolveram a doença espontaneamente, o restante estava associado à extração dentária, infecção ou trauma (13).

É importante distinguir e ressaltar que a ONMB por medicamentos administrados por via oral parece ser menos frequente, menos severa e responde melhor ao tratamento com suspensão da droga e debridamento cirúrgico (12, 21). Os pacientes que recebem a droga por via oral necessitam de um tempo maior de uso do medicamento para apresentarem exposição óssea, geralmente a área de exposição óssea é menor, os sintomas menos severos e existe chance de melhora dos sintomas fazendo um intervalo no uso do medicamento (16).

A sintomatologia dolorosa apresentada na ONMB pode mimetizar com aquela relacionada à osteíte alveolar, sinusite, gengivite/periodontite, cárie, lesões periapicais e distúrbios da articulação temporomandibular (21).

O quadro imaginológico pode ser confundido com osteomielite, osteorradioneecrose, tumores ósseos e sequestros ósseos (29).

2.7 Tratamento

Em estudo realizado em 2008, Sedghizadeh et al encontraram de dois a quinze microorganismos diferentes no biofilme que envolve o osso necrótico nas ONMB. As bactérias identificadas em todas as amostras ósseas eram gram positivas e gram negativas, aeróbios, anaeróbios, e anaeróbios facultativos. Além da presença fúngica da espécie *Cândida* (22).

Os microorganismos mais frequentes encontrados nos ossos expostos são das espécies: *Actinomyces*, *Viellonella*, *Eikenella* e *Moraxella*, *Fusobacterium*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Selenoma*. Todos estes microorganismos são sensíveis à penicilina, sendo essa a droga de escolha para o tratamento dos quadros infeccioso provocados pela doença (15, 22, 28).

O principal objetivo do tratamento para os pacientes que apresentam risco, ou que já desenvolveram a ONMB, é preservar a qualidade de vida do paciente, controlando a dor, quadros de infecção e prevenindo o desenvolvimento de novas áreas de necrose. A literatura relata que o tratamento a ser instituído varia de acordo com o estágio da lesão e com o tipo e via de administração do medicamento (21).

A incidência de ONMB nos pacientes que recebem a dose por via oral para o tratamento, principalmente de osteopenia e osteoporose, é de 0,7: 100.000, pacientes por ano (1, 11).

O risco está associado ao acúmulo de doses por anos de tratamento. Os pacientes devem receber avaliação odontológica cuidadosa incluindo exames radiográficos e orientação quanto à possibilidade de desenvolvimento de ONMB. Quando houver necessidade de algum procedimento cirúrgico, os pacientes devem assinar termo de ciência de riscos concordando com o tratamento (1, 21).

A ênfase para o tratamento dos pacientes recebendo BFs endovenoso é minimizar o risco de ONMB, restringindo a necessidade de procedimentos cirúrgicos. Para isso é necessário que o paciente seja muito bem orientado quanto aos cuidados necessários com sua saúde bucal e quanto aos métodos de higienização. Preferencialmente, antes do início do tratamento, o paciente deve ser avaliado por um cirurgião-dentista quando todos os dentes devem receber avaliação clínica e radiográfica, e o tratamento odontológico restaurador, endodôntico e cirúrgico devem ser realizados (1, 11, 21).

Ruggiero et al apresentam uma definição de estágio, apresentação clínica e tratamento proposto descritos na tabela 1 (21).

A oxigenioterapia em câmara hiperbárica utilizada em conjunto com procedimento cirúrgico realizado seis meses após descontinuidade no uso do BF demonstrou completa resolução da ONMB (31).

Lee, David, Nishime, em 2007, descrevem 2 casos de ONMB tratados com plasma rico em plaquetas (PRP), sendo que um deles foi combinado o uso de PRP e oxigenioterapia em câmara hiperbárica, apresentando sucesso nos dois casos (32).

Técnicas atraumáticas são recomendadas para a realização de procedimentos cirúrgicos em pacientes em uso do BFs. Regev, Lustmann, Nasheg (2008) descreveram técnica de exodontia atraumática por meio de extrusão dentária com elásticos ortodônticos em pacientes em uso de BF (33).

Marx et al. (2005) referiram que devido à diferença no mecanismo da doença da osteoradionecrose e da ONMB, a oxigenioterapia em câmara hiperbárica não apresenta a mesma eficácia no tratamento da ONMB (30).

Vescovi et al., em 2007, realizaram um estudo com o uso de laser de Nd: YAG para o tratamento de ONMB e concluíram que o uso do laser, associado ou não ao procedimento cirúrgico, apresentou melhores resultados clínicos (34).

A dor relatada por pacientes apresentando ONMB pode ser controlada com o uso de laser de baixa potência. Em estudo de Romeo et al. (2011), doze pacientes apresentando quadro de ONMB foram submetidos a tratamento com laser de baixa potência (laser diodo duplo emitindo simultaneamente dois comprimentos de onda $\lambda = 650\text{nm}$ e $\lambda = 904-910\text{nm}$), seis pacientes apresentaram melhora significativa da dor e apenas um paciente relatou piora dos sintomas. Essa piora foi atribuída a re-infecção da área necrótica (35).

Tabela 2.1 - Estágios e conduta perante ONMB Adaptado de: American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws--2009 update." Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons 67(5 Suppl): 2-12

Estágio e Conduta perante ONMB		
Estágio	Apresentação clínica	Conduta
Em risco	Sem exposição óssea	Orientações ao paciente
1	Exposição óssea assintomática com pequena inflamação de tecido mole	Orientações ao paciente, bochechos com soluções antibacterianas, e acompanhamento criterioso
2	Osso exposto com dor, inflamação ou infecção de tecido mole adjacente	Orientações ao paciente, bochechos com soluções antibacterianas, antibioticoterapia, desbridamento ósseo superficial, acompanhamento criterioso
3	Osso exposto com dor, inflamação ou infecção de tecido mole adjacente, podendo apresentar osteólise estendendo-se até borda inferior da mandíbula ou fraturas patológicas e fístulas extra-orais	Orientações ao paciente, bochechos com soluções antibacterianas, cirurgias paliativas e acompanhamento criterioso

O uso da bioestimulação com laser Nd: YAG foi avaliado em vinte e oito pacientes, associado ou não ao tratamento cirúrgico. Os autores observaram que os pacientes que receberam laserterapia durante acompanhamento de 4 a 7 meses apresentaram remissão completa da lesão ou melhora clínica significativa (36).

Acessos cirúrgicos utilizando laser Er:YAG apresentaram melhora do quadro de ONMB quando associado à bioestimulação com laser de baixa potência comparado com terapias convencionais (acesso cirúrgico tradicional ou apenas antibioticoterapia) (37).

Pacientes submetidos a procedimentos que envolvam manipulação de osso medular ou periósteo devem ser avisados quanto ao risco de ONMB e, se possível, deve-se realizar o tratamento de um sextante ou dente por vez, e aguardar um período de dois meses antes de se realizar a abordagem de outro sextante ou elemento (1). Esse período de dois meses foi determinado clinicamente por ser o período que os cirurgiões observaram ocorrer ONMB. Durante esse período, o paciente deve realizar higiene oral rigorosa e bochechos com clorexidine 0,12% duas vezes ao dia (1).

Antibioticoterapia profilática é recomendada para os pacientes que forem submetidos a procedimentos invasivos; sendo que o antibiótico de escolha é a penicilina, e para os alérgicos pode-se optar por uma combinação de quinolonas e metronidazol, ou eritromicina e metronidazol (30). Esses autores não recomendam o uso de clindamicina, devido ao fato de essa apresentar uma lacuna contra *Actinomyces*, *Eikenella corrodens* e espécies similares, que são frequentemente encontradas nos ossos expostos.

A ADA, em 2006, publicou uma tabela com drogas, doses e períodos de antibioticoterapia. Recomendaram que para pacientes não alérgicos à penicilina deve-se fazer o uso de Amoxicilina 500 miligramas via oral três vezes ao dia durante quatorze dias e essa

pode ser associada ou não ao Metronidazol 250 miligramas via oral três vezes ao dia também por um período de quatorze dias. Já para alérgicos à penicilina recomendam o uso de Clindamicina 300 miligramas via oral três vezes ao dia durante quatorze dias ou Azitromicina 250 miligramas via oral três vezes ao dia durante 10 dias (1).

Migliorati et al. (2005) recomendaram o uso de amoxicilina associada ou não à clindamicina para o tratamento da ONMB (9).

O tratamento cirúrgico por meio de debridamento, recobrimento por retalhos ou ressecções, devem ser evitados, e só utilizados após insucesso com tratamentos conservadores, devido ao fato de que os procedimentos cirúrgicos podem aumentar a área exposta e piorar os sintomas do paciente. Como o osso exposto e necrótico, quando não infectado, não apresenta sintomatologia dolorosa, pode-se optar por um tratamento preventivo de infecção, com o uso prolongado de penicilina, e bochechos com clorexidina (30).

Em um estudo prospectivo sobre a toxicidade tecidual dos BFs, Reid, Bolland e Grey, em 2007, discutiram a respeito do não fechamento epitelial das exposições ósseas intraorais secundárias ao uso dos BFs. Atribuem esse fato à toxicidade dos BFs sobre o tecido epitelial provocada pelas altas concentrações de BFs no tecido ósseo (38).

Marx, Cillo e Ulloa (2007), descrevem o uso do teste CTX sérico ou ICTO – telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I, marcador de reabsorção óssea que avalia a excreção de fragmentos específicos produzidos pela hidrólise de colágeno tipo I. Descrevem que os valores do teste podem ser utilizados como parâmetro para se avaliar o risco de desenvolvimento de ONMB. Observaram que há uma relação exponencial direta entre o tempo de uso dos BFs e o tamanho da exposição óssea. Pacientes que apresentarem valores de CTX menores que 150 pg/ml, recomendam que se entre em contato com o médico que prescreveu o BF e estude-se a possibilidade de suspensão do

fármaco por um período de 4 a 6 meses, devendo após esse período, ser realizado novamente o teste. Caso o valor ainda esteja abaixo de 150pg/ml é recomendado que se estenda o período de suspensão do fármaco por um período de 6 a 9 meses. Caso os valores do CTX ainda não sejam superiores a 150pg/ml e caso não seja possível orientar o paciente quanto ao risco de desenvolvimento de ONMB, é recomendado que se busque uma forma de tratamento não invasiva (16).

A propriedade antisséptica do ozônio foi analisada por Deboni em 2009, utilizando água ozonizada (4ppm) para irrigação de alvéolos após exodontias, obtendo redução de bactérias anaeróbias nos alvéolos e não demonstrando toxicidade nessa concentração, nem interferência negativa no processo de reparo (39).

O uso do ozônio para o tratamento de ONMB foi descrito por Ripamonti et al. (2011), utilizando o óleo ozonizado em áreas com ONMB menores do que 2,5cm. Os autores obtiveram sucesso nos 10 casos tratados (40).

2.8 Implantes dentários em pacientes em uso de bisfosfonatos

O efeito do uso dos BFs na osseointegração de implantes dentais ainda não foi claramente estabelecido (7). Há limitadas informações sobre como o uso crônico via oral por longo período de BFs pode atuar na reparação tecidual, em particular, da terapia implanto-suportada (41).

Segundo Jeffcoat (2006), a decisão de qualquer tratamento médico ou odontológico de pacientes que usam BFs orais para tratamento de osteoporose ou osteopenia envolve uma balança de riscos e benefícios. O autor não contra-indicou a instalação de implantes dentários nesses pacientes após realizar estudo com 50 indivíduos, que receberam 210 implantes, divididos em dois grupos: um que recebeu 70mg de alendronato por 1 a 4 anos, e outro placebo, sendo que nenhum paciente apresentou ONMB durante acompanhamento por 3 anos (42).

Grant et al. (2008) realizaram estudo retrospectivo avaliando 115 pacientes submetidos à cirurgia para colocação de 468 implantes dentários que estavam recebendo BFs por via oral, e relataram que nenhum apresentou ONMB. Segundo os autores, o protocolo para tratamento odontológico de pacientes que recebem BFs endovenoso deve ser diferente daqueles que fazem uso via oral, não parecendo que este uso interfira no sucesso dos implantes. Segundo os autores, não há indícios que a colocação de implantes, extrações ou outro tratamento cirúrgico devem ser rotineiramente evitados nos pacientes que fazem uso de BFs via oral (12).

Bell e Bell, em 2008, realizaram estudo retrospectivo com 42 pacientes que realizaram implante dentário com o uso concomitante de BFs por via oral por um período de 6 meses a 11 anos. Relataram um índice de sucesso de 95%, similar ao de 96,5 % descrito na literatura para mesmo cirurgião em pacientes sem

risco de desenvolvimento de ONMB. Concluíram que pacientes que recebem BFs por via oral não apresentam risco maior de perda do implante que pacientes que não recebem este medicamento (43).

Os efeitos a curto e longo prazo para osseointegração precisam ser estabelecidos para aqueles pacientes que recebem potentes BFs como pamidronato ou zoledronato. Os cirurgiões-dentistas devem conscientizar-se para o potencial de fracasso de implantes, ou retardo na reparação, especialmente para pacientes que recebem BFs endovenosos para tratamento de doenças malignas (7).

Marx et al. (2005) contra indicaram a instalação de implantes em pacientes que fazem o uso de BFs ressaltando os riscos de não integração do implante e infecção. (30). Em 2007, Marx et al. aludiram que a colocação de implantes pode ser realizada de maneira segura em pacientes que fazem o uso de BFs por via oral há menos de 3 anos (16).

Fugazzotto et al. (2007) realizaram tratamento odontológico com colocação de implantes osseointegrados em 61 pacientes submetidos à terapia oral com BFs por tempos variados. O seguimento de dois anos desses pacientes constatou que não houve caso de ONMB e todos os implantes foram avaliados como obtendo sucesso. Os autores lembraram que, embora eles não tenham tido indícios de que BFs orais é um fator contribuinte para o desenvolvimento de ONMB, não há duvidas que mais estudos sejam necessários (44).

Javed e Almas, em 2010, enfatizaram que todo paciente que recebe tratamento com BFs e que esperam receber reabilitação oral com colocação de implantes osseointegrados devem ser informados sobre a possibilidade de desenvolver ONMB. Após revisão sistemática da literatura, os autores concluíram que implantes dentais podem osseointegrar e permanecer em função estável em tais pacientes (45).

Torres et al. (2009) descreveram sucesso da reabilitação com implantes osseointegrados em um paciente portador de doença de Paget, que fazia uso de BF oral há 7 anos (46).

Shirota et al. (2009) relataram um caso de ONMB em torno de um implante, região de molar superior, cuja paciente fez uso de pamidronato (dezessete doses) e ácido zoledrônico (nove doses) para tratamento de metástases ósseas após diagnóstico de câncer de mama. Como tratamento, os autores instituíram ressecção da lesão junto com o implante e oxigenioterapia em câmara hiperbárica (47).

Wang, Weber e McCauley, em 2007, reportaram um caso de ONMB em torno de implantes osseointegrados em um paciente que fazia uso há mais de 10 anos de BFs orais para tratamento de osteoporose. O caso obteve sucesso no tratamento da lesão com a realização de antibioticoterapia, anti-sépticos bucais e limpeza cirúrgica do osso necrótico com enxerto ósseo e tetraciclina (41).

Por meio de questionários direcionados a dentistas da região sul da Austrália, Goss et al. (2010) identificaram 7 casos de ONMB associados ao insucesso de implantes osseointegrados, sendo que em três houve falha no processo de osseointegração e em quatro perda desta pelo uso oral dos BFs. Apenas um dos casos havia correlação também com uso de esteróide e presença de diabetes e nenhum caso de insucesso foi reportado pelo uso endovenoso dos BFs. Os autores julgaram que mesmo sendo um baixo risco, o insucesso na osseointegração de implantes, ou a perda desta, pode ocorrer quando terapias orais com BFs são iniciadas antes e após a implantação (48).

2.9 Estudos experimentais

Os BFs vêm sendo estudados em trabalhos *in vitro* buscando compreensão do mecanismo de ação sobre determinadas células.

García - Moreno e colaboradores, em 1998, realizaram estudo sobre o efeito do alendronato em osteoblastos humanos e avaliaram o efeito direto do alendronato em concentrações variando de 10^{-1} a 10^{-12} mol/L quanto a viabilidade, proliferação celular, síntese de colágeno e capacidade de deposição mineral, em osteoblastos humanos normais. Concluíram que o alendronato em concentrações iguais ou superiores a 10^{-4} mol/L afetam a viabilidade dos osteoblastos, em concentrações iguais ou superiores a 10^{-3} mol/L não observaram nenhuma célula viável na cultura. Entre concentrações de 10^{-5} a 10^{-12} mol/L não apresentaram nenhum efeito sobre a capacidade proliferativa das células (49).

O efeito dos BFs na proliferação e maturação dos osteoblastos distinta da ação inibitória dos mesmos nos osteoclastos vem sendo tema de diversos estudos (50-52).

A proliferação celular e a maturação dos osteoblastos perante os BFs foi estudada por Im et al. (2004) (51). Os autores observaram que tanto o alendronato sódico quanto o risedronato tiveram o número de células aumentadas em relação ao controle, com picos na concentração 10^{-8} M. A concentração capaz de inibir o crescimento celular foi a de 10^{-4} M.

O efeito de uma pasta de alendronato sódico em polietilenoglicol, em concentração 2gml^{-1} foi estudada por Moreira et al, em 2005, *in vitro*, em cultura de células endoteliais e *in vivo* no tecido subcutâneo de ratos. No estudo *in vitro* a pasta de alendronato causou diminuição significativa na viabilidade celular comparado ao controle. Nos testes *in vivo* observaram necrose na área em contato com a pasta, presença de micro abscessos e intenso infiltrado inflamatório. Concluíram que essa pasta de

alendronato apresenta alta citotoxicidade tanto *in vitro* quanto *in vivo* (53).

O alendronato e o pamidronato em estudo realizado por Idris et al. (2008), inibiram o crescimento, causaram apoptose e inibiram a prenilação de proteínas de maneira dose dependente em concentrações acima de 20-100 μ M (54).

Xiong e colaboradores, em 2009, descreveram o efeito direto do alendronato na proliferação e diferenciação osteogênica de células semelhantes a osteoblastos MG-63. Observaram que o alendronato aumentou significativamente o número de células com relação ao controle, com efeitos maiores na concentração 10⁻⁸M. Também observaram que a atividade da fosfatase alcalina, e a expressão gênica da proteína morfogenética óssea tipo 2, colágeno tipo I e osteocalcina também aumentaram. O alendronato também estimulou a deposição de cálcio. Concluíram que o alendronato além de inibir a reabsorção óssea pelos osteoclastos, também promove proliferação e maturação de osteoblastos (55).

Fibroblastos do ligamento periodontal de humanos foram submetidos à análise de citotoxicidade com alendronato sódico. Testes de viabilidade e proliferação celular foram utilizados com o alendronato sódico nas concentrações 10⁻⁵M, 10⁻⁶M, 10⁻⁷M. Este estudo teve como conclusão que o alendronato sódico em contato direto com fibroblastos do ligamento periodontal humano é citotóxico em concentrações maiores que 10⁻⁶M (56)

A influência dos BFs nitrogenados e não-nitrogenados em células endoteliais (HUVEC) fibroblastos gengivais humano e células osteogênicas humanas foi observado por Walter et al. (2010). Observaram que os compostos nitrogenados pamidronato e ácido zoledrônico apresentaram impacto negativo maior nas linhagens celulares que o composto não nitrogenado clodronato. Os autores referem que ONMB pode ser um evento multifatorial com deficiências multicelulares (57).

A redução da atividade celular de fibroblastos gengivais e fibroblastos do ligamento periodontal humanos, em contato com

ácido zoledrônico nas concentrações de 30 μ M e 100 μ M, foi observada, em 2010, por Agis et al. (58). O ácido zoledrônico diminuiu a viabilidade e proliferação celular, além da síntese de proteína dos dois tipos de fibroblastos.

Em estudo realizado por Tipton e colaboradores (2011), o alendronato e o pamidronato em contato com fibroblastos gengivais humanos alteraram a produção do mediador osteoprogenitor (59).

O ácido zoledrônico em baixas concentrações provocou apoptose e inibição do crescimento celular de fibroblastos e células epiteliais em cultura no estudo realizado por Scheper M et al. (2009). Os autores consideraram esse achado como potencial mecanismo para o desenvolvimento de ONMB (60).

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar comparativamente o efeito de diferentes concentrações do alendronato sódico sobre a viabilidade e proliferação de osteoblastos e fibroblastos em cultura, utilizando a análise de atividade mitocondrial celular.

4 METODOLOGIA

Após aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) (Parecer número 131/10 – Anexo A), os experimentos foram realizados junto ao laboratório de Pesquisa Básica “Edmir Matson” do Departamento de Dentística da FOUSP.

4.1 Linhagem celular

Foram utilizadas duas linhagens celulares, a saber: linhagem OSTEO 1 que são células osteoblastos-símile originadas de perióstio de osso parietal de ratos recém-nascidos (61), e a linhagem FMM1 (62) de fibroblastos de mucosa bucal humana, cedidas pelo laboratório de Pesquisa Básica “Edmir Matson” do Departamento de Dentística da FOUSP.

4.2 Cultivo celular

Um tubo criogênico, armazenado em nitrogênio líquido de cada uma das linhagens utilizadas para o estudo, que estavam 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 foi 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 mantido 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 (63).

A monitorização do crescimento celular foi realizada diariamente utilizando-se microscópio invertido de fase e o meio de cultura trocado a cada 2 dias, de acordo com o metabolismo celular (Figura 4.1).

Figura 4.1 – Fotomicrografia células em subconfluência : a – Linhagem FMM1 – Aumento 10 vezes. b – Linhagem OSTEO 1 em aumento 10 vezes.

Após ocuparem 70% da área cultivável do frasco, processo denominado subconfluência, as células foram subcultivadas. Para tal, o meio de cultura do frasco era 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 ressuspenso 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.

4.3 Substância testada

A substância utilizada para a realização do experimento foi o Alendronato sódico a 99% (Fórmula e Ação, São Paulo, SP, Brasil), apresentado peso molecular de 325,12 e fórmula química $C_4H_{12}NNaO_7P_2 \cdot 3H_2O$ (Figura 4.2).

Figura 4.2 – Estrutura química Alendronato Sódico

O alendronato sódico entrou em contato com as células em cultura na forma de solução com concentrações de 10^{-2}M a 10^{-8}M .

A solução estoque de 10^{-2}M foi obtida pela diluição de 0,03g de alendronato sódico para cada 10 ml de meio de cultura DMEM (ISO 7405, 1997(64)). Essa solução foi agitada em agitador mecânico tipo vortex e mantida em banho Maria a 37°C por 15 minutos. Após esse período essa solução foi filtrada com filtro Millipore de $0,22\mu\text{m}$ de diâmetro. Para obtenção das outras concentrações da solução de alendronato sódico, 1 ml da solução estoque (10^{-2}M) foi removida e colocada em um tubo de ensaio com mais 9ml de meio fresco, homogeneizada e assim foi obtida uma nova concentração de 10^{-3}M . Esse procedimento foi repetido a fim de se obter diluições correspondentes às concentrações de 10^{-4}M , 10^{-5}M , 10^{-6}M , 10^{-7}M e 10^{-8}M .

4.4 Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram divididos de acordo com a concentração de alendronato sódico, a saber:

Grupo Controle – não recebeu a droga

Grupo 10^{-8} – recebeu a droga em uma concentração de 10^{-8}M

Grupo 10^{-7} – recebeu a droga em uma concentração de 10^{-7}M

Grupo 10^{-6} – recebeu a droga em uma concentração de 10^{-6}M

Grupo 10^{-5} – recebeu a droga em uma concentração de 10^{-5}M

Grupo 10^{-4} – recebeu a droga em uma concentração de 10^{-4}M

Grupo 10^{-3} – recebeu a droga em uma concentração de 10^{-3}M

Grupo 10^{-2} – recebeu a droga em uma concentração de 10^{-2}M

4.5 Experimento

Para a determinação do número de células existentes no frasco original os precipitados foram ressuspensos em 1 ml de PBSA, e 0,1ml dessa suspensão celular dispensada em um tubo de ensaio, sendo 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. As células coradas em azul representaram as células mortas, enquanto que as células não coradas as viáveis.

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 conseguimos obter 1000 células em cada 100µl, conforme metodologia descrita por Freshney (2000) (63). Tal suspensão de células foi então plaqueada em placas de 96 poços distribuindo 1000 células para cada poço para o experimento de viabilidade celular e 500 células para cada poço em cada grupo experimental para o experimento de proliferação celular. Para garantir homogeneidade na distribuição das células entre os poços foi utilizado um pipetador multicanal. O plaqueamento foi realizado distribuindo os grupos de maneira aleatória em 4 poços por vez na vertical ou na horizontal, nunca realizando o plaqueamento de um grupo todo de uma única vez, conforme a figura 4.3.

Essas placas foram utilizadas nos experimentos de viabilidade e proliferação celular

Figura 4.3 - Fotografia ilustrando o plaqueamento com pipetador multicanal

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 100 μ l de meio DME fresco, sendo realizadas 8 réplicas para cada grupo experimental testado, totalizando 64 poços. (Figura 4.4)

Após o período de 24 horas, aguardado para aderência das células ao fundo dos poços, os meios de cultivo foram removidos e substituídos por 200 μ l dos meios de cultivo contendo as diversas concentrações de alendronato sódico que foram adicionadas aos respectivos poços na placa de cultivo. Nos poços do grupo controle foram colocados 200 μ l de meio fresco. Os meios de cultivo contendo o alendronato sódico 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 100 μ l de meio de cultivo fresco e 10 μ l 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 repetidos pelo menos sete vezes.

Figura 4.4 – Esquema de plaqueamento em placa de 96 poços demonstrando distribuição dos grupos experimentais

4.5.2 Proliferação Celular

Em decorrência da evolução da pesquisa tornou-se interessante a complementação da análise de citotoxicidade com o teste de proliferação celular. Como as respostas das duas

linhagens celulares (OSTEO1 e FMM1) não foram discrepantes optamos por utilizar somente a linhagem OSTEO1.

Observou-se o crescimento celular, em 4 períodos, de células tratadas com todas as concentrações do alendronato sódico estudado, a saber 10^{-2} M a 10^{-8} M na diluição de 10 vezes.

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 (500 células por poço) uma para cada tempo experimental de zero, 24, 48 e 72 horas. Em cada placa foram semeadas 8 réplicas de cada grupo experimental (8 grupos), totalizando 64 poços por placa.

No tempo zero, ou seja, 24 horas após o contato das células com os meios contendo o alendronato sódico, 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 curvas de crescimento para cada grupo experimental.

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 foram analisados pelo método ANOVA – 1 critério, complementado pelo teste de Tukey, com nível de significância de 1% ($p \leq 0,01$). Foi utilizado o programa estatístico BioEstat versão 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 Viabilidade Celular

Os dados da atividade mitocondrial, determinados pela mensuração da DO pelo teste do MTT, foram transformados em porcentagem em relação à média de cada grupo que foi considerado 100% (Apêndice A - Tabela 2).

Os fibroblastos da linhagem FMM1, após serem submetidos ao meio de cultivo contendo o alendronato sódico nas concentrações de 10^{-2}M a 10^{-8}M apresentaram diminuição estatisticamente significativa de viabilidade celular apenas na concentração de 10^{-2}M ($p < 0,01$) (Gráfico 5.1).

Gráfico 5.1 - Viabilidade celular média da linhagem FMM1 em resposta a diferentes concentrações de alendronato sódico. * Resultado significativamente menor que o do controle ($p < 0,01$). Barras representam o erro da média.

Os osteoblastos da linhagem OSTE01 após serem submetidos ao meio contendo o alendronato sódico nas concentrações de 10^{-2}M a 10^{-8}M demonstraram viabilidade celular no grupo controle significativamente maior que a de todos os

demaís grupos. (Apêndice A – Tabela 3) O grupo tratado com o alendronato na concentração de 10^{-4}M apresentou viabilidade celular semelhante a de todos os grupos, exceto ao do grupo de concentração 10^{-2}M . A viabilidade celular dos demais grupos foi semelhante entre si ($p < 0,01$) (Gráfico 5.2).

Gráfico 5.2 - Viabilidade celular média da linhagem OSTEO1 em resposta a diferentes concentrações de alendronato sódico. * Controle significativamente maior que os demais grupos. Δ igual a todos os grupos exceto ao grupo de concentração 10^{-2}M . ($p < 0,01$). As barras indicam os erros da média.

Apesar dos grupos com alendronato sódico mostrarem viabilidade celular significativamente menor que a do controle, todas as culturas tratadas mantiveram viabilidade celular superior a 50%. Isso nos levou 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 3 ilustra as curvas de crescimento de células OSTEO1 dos diversos grupos experimentais nos tempos entre zero e 72 horas do experimento de proliferação celular. No período de 72 horas observou-se crescimento significativo ($p \leq 0,01$) apenas nos grupos controle, $10^{-8}M$, $10^{-7}M$ e $10^{-6}M$. As concentrações maiores de alendronato impediram o crescimento celular, uma vez que não houve aumento significativo do número de células nestes grupos no decorrer das 72 horas do experimento de proliferação.

Gráfico 5.3 – Curva de Crescimento Celular da linhagem OSTEO 1 – submetidas a diferentes concentrações de alendronato sódico. * número de células viáveis, significativamente maior que as células do mesmo grupo experimental no tempo zero (crescimento significativo $p < 0,01$). Os dados são média e as barras o erro padrão da média.

6 DISCUSSÃO

Desde 2003 diversos trabalhos têm sido publicados com relatos ONMB. Embora tenha sido nesse ano a primeira correlação relatada entre o uso de BF e o aparecimento de ONMB (5), esta lesão já havia sido identificada previamente, tanto relacionada ao uso farmacológico como industrial dos BFs (2, 6).

Recentemente, os jornais diários têm relatado casos em suas páginas. O jornal Folha de São Paulo do dia sete de fevereiro de 2011, realizou reportagem relatando os benefícios dos BFs e citou, dentre os riscos, a possibilidade de desenvolvimento de ONMB. O jornal americano New York Times, em reportagem publicada em novembro de 2010, descreve o caso de uma paciente que está processando o fabricante de determinado medicamento, por ter desenvolvido ONMB após uso dessa medicação (65, 66). Estes fatos vêm corroborar com a atualidade do tema e a importância em se determinar o exato mecanismo do desenvolvimento da ONMB.

Os testes utilizados em nosso trabalho em fibroblastos e osteoblastos visaram contribuir para o entendimento do comportamento das células desses tecidos frente ao contato com a droga. Foi possível observar que os fibroblastos de mucosa, apresentaram maior tolerância em contato com o alendronato sódico, mostrando diminuição da viabilidade celular significativa apenas na maior concentração da droga utilizada nesse estudo (10^{-2} M). Com a utilização de fibroblastos do ligamento periodontal Correia e colaboradores em 2006, observaram toxicidade em concentrações superiores a 10^{-6} M (56). Essa diferença pode ser atribuída ao fato de que os fibroblastos de ligamento periodontal são células mais diferenciadas, o que pode levar a menor tolerância à droga. De fato, nossos resultados utilizando os osteoblastos foram semelhantes aos de Correia et al. (56), uma vez que a toxicidade ocorreu a partir da concentração 10^{-5} M.

Vale ressaltar que os fibroblastos de ligamento periodontal e os osteoblastos são células mais diferenciadas que os fibroblastos de mucosa bucal e também, são células semelhantes capazes de produzir matriz que se mineraliza (67).

O fato de ter ocorrido proliferação dos osteoblastos em contato com o alendronato sódico em concentrações menores do que 10^{-5}M , corroboram com o estudo de von Knoch et al. (2005) (52), onde os autores observaram que em concentração de 10^{-8}M o alendronato foi capaz de permitir a diferenciação osteogênica de células mesenquimais de medula óssea. Esse fato demonstra que o alendronato em baixas concentrações pode ter um efeito anabólico nos osteoblastos.

A literatura também levanta uma dúvida com relação ao papel do tecido mole na etiopatogenia da ONMB, nossos achados demonstraram que os fibroblastos são afetados pelo alendronato sódico em altas concentrações, já o estudo de Scheper et al. (2009) (60) demonstrou que o ácido zoledrônico em baixas concentrações foi capaz de provocar a apoptose e diminuição da proliferação celular dos fibroblastos. Essa diferença pode ser atribuída ao fato de que o ácido zoledrônico é um bisfosfonato mais potente do que o alendronato sódico. Assim como esses autores acreditamos que os bisfosfonatos afetam o comportamento de células em cultura de maneira dose dependente.

Até o momento, a etiopatogenia da ONMB permanece incerta. A literatura sugere que os mecanismos de ação dos BFs resultem em atividade antiosteoclástica e antiangiogênica, o que altera o metabolismo ósseo, com conseqüente inibição da reabsorção óssea e diminuição do *turnover* ósseo (2, 22). Por outro lado essas lesões também poderiam ser decorrentes de morte de outros tipos celulares como os fibroblastos e osteoblastos. De fato essa citotoxicidade foi demonstrada nesse estudo. Porém este achado deve ser melhor investigado no sentido de confirmar ou não esta hipótese.

Assim sendo, apesar de a etiopatogenia da ONMB ainda permanecer incerta, baseados nos nossos achados podemos inferir que a lesão se perpetua não somente pelos problemas já discutidos na literatura referentes a vascularização, na verdade após o trauma, uma das causas mais frequentes que leva a ONMB (13), a inibição de proliferação dos osteoblastos pode ser fator de extrema importância que necessita de maiores investigações no futuro.

Para realização do estudo de proliferação celular dos osteoblastos, tentamos simular uma situação clínica, quando realizamos a diluição do meio de cultura contendo o alendronato sódico nos diferentes 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.

Não há dúvidas que os riscos dos pacientes usuários de BFs desenvolverem ONMB são maiores quando este uso for realizado pela via endovenosa do que pela via oral (29). A ADA, 2006, e a AAOMS, 2009, corroboram que tal risco é dose/tempo dependente (1, 11). Acredita-se que seja necessário no mínimo três anos de uso via oral ou seis meses de uso endovenoso para aqueles pacientes poderem apresentar ONMB (15). Porém, este tempo é baseado apenas nas observações clínicas dos autores, sem previsibilidade ou precisão.

Os mesmos fatores que deliberam os riscos de desenvolver ONMB, também intervêm na severidade das lesões. Assim, características clínicas severas são mais frequentes quando a administração do BF for realizada por via endovenosa do que por via oral, bem como são também relacionados à dose e dosagem. Estas características denotam maior área de osso necrótico exposto, presença de sintomatologia dolorosa e de infecção e insensibilidade ao tratamento instituído (12, 16, 28).

Frente aos casos de ONMB publicados, podemos observar que ONMB associado ao uso oral dos BFs para tratamento de

osteoporose equivaleu a: 30 casos relatos por Marx et al. (2007); 5,3% dos 78 casos levantados por Abu-Id et al. (2007); 26 casos revisados por Pazianas et al. (2007); 5,8 % dos 481 revisados por King e Umland (2008); três entre 119 relatados por Marx et al. (2005); um entre 17 casos estudados por Migliorati et al. (2005); 7 entre os 63 pacientes do estudo retrospectivo de Ruggiero et al. (2004) (7, 13, 14, 16, 17, 27, 30).

Como as opções de tratamento das lesões de ONMB - controle da dor, antibióticoterapia, uso de enxaguatórios bucais, suspensão do BF, a oxigenioterapia em câmara hiperbárica, laserterapia, e desbridamento cirúrgico (30-32, 34) nem sempre alcançam resolução do quadro clínico, lembramos que a melhor opção é a prevenção ao aparecimento da lesão. Incluímos entre as medidas preventivas: adequação do meio bucal previamente ao regime terapêutico do BF; controles clínicos e radiográficos periódicos; orientação ao paciente; e adequada propedêutica clínico-cirúrgica (1, 21).

O ozônio parece ser uma alternativa para o tratamento da ONMB. Baseado no trabalho de Deboni (2009) (39), utilizamos água ozonizada para o tratamento de 3 pacientes apresentando ONMB que procuraram a clínica de cirurgia da FOUSP. Observamos nesses casos melhora dos sinais clínicos, semelhantes aos descritos por Ripamonti et al. (2011) (40). Este fato nos instigou a iniciar uma investigação com relação ao comportamento celular dos osteoblastos e fibroblastos frente aos BFs.

Os testes *in vitro* podem apresentar inúmeras controvérsias, visto que não se sabe ao certo qual a concentração exata da droga que entra em contato com os tipos celulares testados e também as condições clínicas são diferentes das proporcionadas pelos testes laboratoriais. Porém, assim como Agis et al. (2010) (58), concordamos que os resultados dos estudos *in vitro* podem ser considerados como uma pequena peça para a solução de um

quebra-cabeças tão complexo que seria o entendimento da etiopatogenia da ONMB.

Existe muito a ser investigado sobre a ONMB, estudos *in vitro* podem ajudar a compreender o efeito das medicações nas células permitindo entender melhor a etiopatogenia da ONMB, e o uso de laserterapia e ozonioterapia em células em cultura tratadas com os BFs pode ajudar a estabelecer protocolos clínicos cientificamente embasados para o tratamento da ONMB.

7 CONCLUSÕES

Dentro dos seus limites metodológicos esse estudo permitiu concluir que:

- O Alendronato sódico é citotóxico para células osteoblastos-símile e fibroblastos em cultura, dependendo de sua concentração
- Fibroblastos são menos sensíveis a concentrações maiores de alendronato sódico que os osteoblastos.
- O alendronato sódico em concentrações maiores que $10^{-5}M$ inibem a capacidade proliferativa de osteoblastos em cultura.

REFERÊNCIAS¹

1. ADA. Dental management of patients receiving oral bisphosphonate therapy: expert panel recommendations. J Am Dent Assoc. [Practice Guideline]. 2006 Aug;137(8):1144-50.
2. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. Endocr Rev. 1998 Feb;19(1):80-100.
3. Hillner BE, Ingle JN, Berenson JR, Janjan NA, Albain KS, Lipton A, et al. American Society of Clinical Oncology guideline on the role of bisphosphonates in breast cancer. American Society of Clinical Oncology Bisphosphonates Expert Panel. J Clin Oncol. 2000 Mar;18(6):1378-91.
4. de Groen PC, Lubbe DF, Hirsch LJ, Daifotis A, Stephenson W, Freedholm D, et al. Esophagitis associated with the use of alendronate. N Engl J Med. [Case Reports Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 1996 Oct 3;335(14):1016-21.
5. Marx R. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. J Oral Maxillofac Surg. 2003;61(9):1115-7.
6. Marx R. Uncovering the Cause of “Phossy Jaw” Circa 1858 to 1906: Oral and Maxillofacial Surgery Closed Case Files—Case Closed. J Oral Maxillofac Surg. 2008;66(11):2356-63.
7. Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. J Oral Maxillofac Surg. 2004 May;62(5):527-34.
8. Hohneker JA, Bess AL. Important drug precaution for dental health professionals with patients being treated for cancer. Tex Dent J. 2005 Sep;122(9):973-4.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

9. Migliorati CA, Casiglia J, Epstein J, Jacobsen PL, Siegel MA, Woo SB. Managing the care of patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis: an American Academy of Oral Medicine position paper. *J Am Dent Assoc.* [Review]. 2005 Dec;136(12):1658-68.
10. AAOMS. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007 Mar;65(3):369-76.
11. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws--2009 update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009 May;67(5 Suppl):2-12.
12. Grant BT, Amenedo C, Freeman K, Kraut RA. Outcomes of placing dental implants in patients taking oral bisphosphonates: a review of 115 cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008 Feb;66(2):223-30.
13. Migliorati CA, Schubert MM, Peterson DE, Seneda LM. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of mandibular and maxillary bone: an emerging oral complication of supportive cancer therapy. *Cancer.* 2005 Jul 1;104(1):83-93.
14. Abu-Id MH, Warnke PH, Gottschalk J, Springer I, Wiltfang J, Acil Y, et al. "Bis-phossy jaws" - high and low risk factors for bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *J Craniomaxillofac Surg.* [Multicenter Study]. 2008 Mar;36(2):95-103.
15. Sawatari Y, Marx RE. Bisphosphonates and bisphosphonate induced osteonecrosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* [Review]. 2007 Nov;19(4):487-98.
16. Marx RE, Cillo JE, Ulloa JJ. Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007 Dec;65(12):2397-410.

17. King AE, Umland EM. Osteonecrosis of the jaw in patients receiving intravenous or oral bisphosphonates. *Pharmacotherapy*. [Review]. 2008 May;28(5):667-77.
18. Kumar SK, Meru M, Sedghizadeh PP. Osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy: a case series. *J Contemp Dent Pract*. 2008;9(1):63-9.
19. Berenson JR, Hillner BE, Kyle RA, Anderson K, Lipton A, Yee GC, et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guidelines: the role of bisphosphonates in multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2002 Sep 1;20(17):3719-36.
20. Cheng YY, Huang L, Kumta SM, Lee KM, Lai FM, Tam JS. Cytochemical and ultrastructural changes in the osteoclast-like giant cells of giant cell tumor of bone following bisphosphonate administration. *Ultrastruct Pathol*. 2003 Nov-Dec;27(6):385-91.
21. Ruggiero SL, Woo SB. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Dent Clin North Am*. [Review]. 2008 Jan;52(1):111-28.
22. Sedghizadeh PP, Kumar SK, Gorur A, Schaudinn C, Shuler CF, Costerton JW. Identification of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008 Apr;66(4):767-75.
23. Huja SS, Fernandez SA, Hill KJ, Li Y. Remodeling dynamics in the alveolar process in skeletally mature dogs. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. [Research Support, N.I.H., Extramural]. 2006 Dec;288(12):1243-9.
24. Fleisch H. Bisphosphonates in osteoporosis. *Eur Spine J*. [Review]. 2003 Oct;12 Suppl 2:S142-6.
25. Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2000 Jun 15;88(12 Suppl):2961-78.
26. Marx RE. Oral & Intravenous Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaws: History, Etiology, Prevention, and Treatment: Quintessence Publishing; 2006.

27. Pazianas M, Miller P, Blumentals WA, Bernal M, Kothawala P. A review of the literature on osteonecrosis of the jaw in patients with osteoporosis treated with oral bisphosphonates: prevalence, risk factors, and clinical characteristics. Clin Ther. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2007 Aug;29(8):1548-58.

28. Woo SB, Hande K, Richardson PG. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates. N Engl J Med. 2005 Jul 7;353(1):99-102; discussion 99-.

29. Mariotti A. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. J Dent Educ. 2008 Aug;72(8):919-29.

30. 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 Nov;63(11):1567-75.

31. 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. [Multicenter Study]. 2007 May-Jun;28(3):158-63.

32. Lee CY, David T, Nishime M. Use of platelet-rich plasma in the management of oral bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a report of 2 cases. J Oral Implantol. [Case Reports Review]. 2007;33(6):371-82.

33. Regev E, Lustmann J, Nashef R. Atraumatic teeth extraction in bisphosphonate-treated patients. J Oral Maxillofac Surg. 2008 Jun;66(6):1157-61.

34. 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 Dec;45(8):628-32.

35. Romeo U, Galanakis A, Marias C, Vecchio AD, Tenore G, Palaia G, et al. Observation of Pain Control in Patients with

Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis Using Low Level Laser Therapy: Preliminary Results. *Photomed Laser Surg.* 2011 Jan(X): 1-6.

36. Vescovi P, Merigo E, Manfredi M, Meleti M, Fornaini C, Bonanini M, et al. Nd:YAG laser biostimulation in the treatment of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: clinical experience in 28 cases. *Photomed Laser Surg.* 2008 Feb;26(1):37-46.

37. Vescovi P, Manfredi M, Merigo E, Meleti M, Fornaini C, Rocca JP, et al. Surgical approach with Er:YAG laser on osteonecrosis of the jaws (ONJ) in patients under bisphosphonate therapy (BPT). *Lasers Med Sci.* 2010 Jan;25(1):101-13.

38. Reid I, Bolland M, Grey A. Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? *Bone.* 2007;41(3):318-20.

39. Deboni MCZ. Antissepsia de alvéolos pós-exodontia empregando irrigações trans-operatórias de solução de ozônio diluído em água. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.

40. Ripamonti CI, Cislighi E, Mariani L, Maniezzo M. Efficacy and safety of medical ozone (O(3)) delivered in oil suspension applications for the treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with bone metastases treated with bisphosphonates: Preliminary results of a phase I-II study. *Oral Oncol.* 2011 Feb 8.

41. Wang HL, Weber D, McCauley LK. Effect of long-term oral bisphosphonates on implant wound healing: literature review and a case report. *J Periodontol.* [Case Reports Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2007 Mar;78(3):584-94.

42. Jeffcoat MK. Safety of oral bisphosphonates: controlled studies on alveolar bone. *Int J Oral Maxillofac Implants.* [Randomized Controlled Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006 May-Jun;21(3):349-53.

43. Bell BM, Bell RE. Oral bisphosphonates and dental implants: a retrospective study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008 May;66(5):1022-4.

44. Fugazzotto PA, Lightfoot WS, Jaffin R, Kumar A. Implant placement with or without simultaneous tooth extraction in patients taking oral bisphosphonates: postoperative healing, early follow-up, and the incidence of complications in two private practices. *J Periodontol*. 2007 Sep;78(9):1664-9.
45. Javed F, Almas K. Osseointegration of dental implants in patients undergoing bisphosphonate treatment: a literature review. *J Periodontol*. [Review]. 2010 Apr;81(4):479-84.
46. Torres J, Tamimi F, Garcia I, Herrero A, Rivera B, Sobrino JA, et al. Dental implants in a patient with Paget disease under bisphosphonate treatment: a case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. [Case Reports Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Mar;107(3):387-92.
47. Shirota T, Nakamura A, Matsui Y, Hatori M, Nakamura M, Shintani S. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw around dental implants in the maxilla: report of a case. *Clin Oral Implants Res*. [Case Reports]. 2009 Dec;20(12):1402-8.
48. Goss A, Bartold M, Sambrook P, Hawker P. The nature and frequency of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in dental implant patients: a South Australian case series. *J Oral Maxillofac Surg*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Feb;68(2):337-43.
49. Garcia-Moreno C, Serrano S, Nacher M, Farre M, Diez A, Marinoso ML, et al. Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts. *Bone*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1998 Mar;22(3):233-9.
50. Giuliani N, Pedrazzoni M, Negri G, Passeri G, Impicciatore M, Girasole G. Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures in vitro and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo. *Bone*. 1998 May;22(5):455-61.
51. Im GI, Qureshi SA, Kenney J, Rubash HE, Shanbhag AS. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials*. [Comparative Study Evaluation Studies Research

Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2004 Aug;25(18):4105-15.

52. von Knoch F, Jaquier C, Kowalsky M, Schaeren S, Alabre C, Martin I, et al. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials*. [Comparative Study Evaluation Studies Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2005 Dec;26(34):6941-9.

53. Moreira MS, Katayama E, Bombana AC, Marques MM. Cytotoxicity analysis of alendronate on cultured endothelial cells and subcutaneous tissue. a pilot study. *Dent Traumatol*. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Dec;21(6):329-35.

54. Idris AI, Rojas J, Greig IR, Van't Hof RJ, Ralston SH. Aminobisphosphonates cause osteoblast apoptosis and inhibit bone nodule formation in vitro. *Calcif Tissue Int*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2008 Mar;82(3):191-201.

55. Xiong Y, Yang HJ, Feng J, Shi ZL, Wu LD. Effects of alendronate on the proliferation and osteogenic differentiation of MG-63 cells. *J Int Med Res*. 2009 Mar-Apr;37(2):407-16.

56. Correia VFP, Caldeira CL, Marques MM. Cytotoxicity evaluation of sodium alendronate on cultured human periodontal ligament fibroblasts. *Dent Traumatol*. 2006 Dec;22(6):312-7.

57. Walter C, Klein MO, Pabst A, Al-Nawas B, Duschner H, Ziebart T. Influence of bisphosphonates on endothelial cells, fibroblasts, and osteogenic cells. *Clin Oral Investig*. 2010 Feb;14(1):35-41.

58. Agis H, Blei J, Watzek G, Gruber R. Is zoledronate toxic to human periodontal fibroblasts? *J Dent Res*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Jan;89(1):40-5.

59. Tipton DA, Seshul BA, Dabbous M. Effect of bisphosphonates on human gingival fibroblast production of mediators of osteoclastogenesis: RANKL, osteoprotegerin and interleukin-6. *J*

Periodontal Res. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. 2011 Feb;46(1):39-47.

60. 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. [Comparative Study Research Support, N.I.H., Extramural]. 2009 Mar;144(5):667-76.

61. Deboni MCZ, Marques MM, Araújo NS. Obtencao e caracterizacao de linhagem de celulas osteoblasticas. RPG Universidade de São Paulo. 1996 jul./ago;3(3):220-9.

62. 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. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2000 Apr;71(4):540-5.

63. Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic techniques. 4th ed. ed. New York: Wiley-Liss; 2000.

64. Dentistry -- Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry -- Test methods for dental materials, ISO 7405, 1997(1997).

65. Versolato M. Medicamento para osteoporose faz paciente viver mais. Folha de São Paulo. 2011 07/02/2011;Sect. 1.

66. Singer N. Drug Suits Raise Questions for Doctors, and Juries. New York Times. 2010 November 10, 2010.

67. Eduardo Katchburian, Arana-Chavez VE. Histologia e embriologia oral texto-atlas-correlações clínicas 2º ed. Rio de Janeiro Guanabara-Koogan; 2004.

APÊNDICE A – Dados da atividade mitocondrial

Tabela 2 – Média e Erro Padrão para o percentual de atividade mitocondrial dos grupos experimentais das células FMM1

GRUPOS	Média	Erro Padrão
Controle	96.4863	4.8686
10⁻⁸	80.5719	4.2049
10⁻⁷	69.7871	4.68
10⁻⁶	62.08	5.3951
10⁻⁵	69.0946	9.4163
10⁻⁴	83.2906	10.1185
10⁻³	80.2898	5.9308
10⁻²	15.8246	3.9032

Tabela 3 – Média e Erro Padrão para o percentual de atividade mitocondrial dos grupos experimentais das células OSTE01

GRUPOS	Média	Erro Padrão
Controle	100.2032	3.2758
10⁻⁸	74.822	4.1899
10⁻⁷	74.6537	4.8089
10⁻⁶	73.5943	6.1985
10⁻⁵	65.822	5.0235
10⁻⁴	83.43	6.1891
10⁻³	69.6023	6
10⁻²	56.4679	4.0623

Tabela 4 – Média e Erro Padrão da atividade mitocondrial dos grupos experimentais das células OSTEO1 Tempo Zero

GRUPOS	Média	Erro Padrão
Controle	0.034	0.0047
10⁻⁸	0.0506	0.0057
10⁻⁷	0.0343	0.0029
10⁻⁶	0.0241	0.0061
10⁻⁵	0.0164	0.004
10⁻⁴	0.0283	0.0046
10⁻³	0.0453	0.0062
10⁻²	-0.0028	0.0056

Tabela 5 – Média e Erro Padrão da atividade mitocondrial dos grupos experimentais das células OSTEO1 Tempo 24 horas

GRUPOS	Média	Erro Padrão
Controle	0.2408	0.0047
10⁻⁸	0.2304	0.0055
10⁻⁷	0.2174	0.0051
10⁻⁶	0.1919	0.0046
10⁻⁵	0.098	0.0066
10⁻⁴	0.124	0.0102
10⁻³	0.1123	0.0036
10⁻²	0.1071	0.0068

Tabela 6 – Média e Erro Padrão da atividade mitocondrial dos grupos experimentais das células OSTEO1 Tempo 48 horas

GRUPOS	Média	Erro Padrão
Controle	0.1784	0.006
10⁻⁸	0.2936	0.0134
10⁻⁷	0.2973	0.0115
10⁻⁶	0.2868	0.0198
10⁻⁵	0.046	0.0065
10⁻⁴	0.044	0.0057
10⁻³	0.0536	0.0044
10⁻²	0.1354	0.0119

Tabela 7 – Média e Erro Padrão da atividade mitocondrial dos grupos experimentais das células OSTEO1 Tempo 72 horas

GRUPOS	Média	Erro Padrão
Controle	0.4165	0.0162
10⁻⁸	0.4459	0.0116
10⁻⁷	0.4719	0.0127
10⁻⁶	0.4406	0.008
10⁻⁵	0.0316	0.0044
10⁻⁴	0.0369	0.0049
10⁻³	0.0503	0.0037
10⁻²	0.1231	0.012

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comitê de Ética em Pesquisa**PARECER DE APROVAÇÃO
FR348221
Protocolo 131/10**

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o Projeto de pesquisa **“Análise do efeito da saliva de usuárias de alendronato sódico sobre a viabilidade e proliferação de células em cultura”**, de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Mariana Aparecida Brozowski, sob orientação da Profa. Dra. Maria da Graça Naclério Homem.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em “cd”. Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 18 de agosto de 2010.

Profa. Dra. Marcia Turola Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP