

MARIANA APARECIDA BROZOSKI

Efeito da laserfototerapia sobre a viabilidade de diferentes tipos celulares submetidos a diferentes concentrações do alendronato sódico e ácido zoledrônico

São Paulo

2014

MARIANA APARECIDA BROZOSKI

**Efeito da laserfototerapia sobre a viabilidade de diferentes tipos
celulares submetidos a diferentes concentrações do alendronato
sódico e ácido zoledrônico**

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilofaciais

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Naclério Homem

Co-orientadora: Profa. Dra. Marcia Martins Marques

São Paulo
2014

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 da Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Brozoski, Mariana Aparecida.

Efeito da laserfototerapia sobre a viabilidade de diferentes tipos celulares submetidos a diferentes concentrações do alendronato sódico e ácido zoledrônico/ Mariana Aparecida Brozoski; orientadora Maria da Graça Naclério Homem. -- São Paulo, 2014.

59 p. : il. : fig., graf. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilofaciais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Osteonecrose - Maxilares. 2. Doenças maxilares. 3. Bisfosfonatos. 4. Laser-Fototerapia. I. Homem, Maria da Graça Naclério. II. Título.

Brozoski, MA. Efeito da laserfototerapia sobre a viabilidade de diferentes tipos celulares submetidos a diferentes concentrações do alendronato sódico e ácido zoledrônico. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho aos meus pais **João e Terezinha Brozowski**, e ao meu irmão **Ivan Brozowski**, por continuarem sempre me apoiando na continuação dos estudos e concretização dos meus sonhos.

Ao meu marido **Rafael Salla Paulilo**, por acreditar e fazer deste um projeto da nossa família, me ajudando em todas as fases e compreendendo a dedicação necessária para a realização desse estudo.

Ao **Bonner**, o filhote mais lindo do mundo, meu maior companheiro, que sempre me acolhe e me anima com seu amor puro e verdadeiro.

Deus, obrigada por sua constante presença em minha vida. Ao Seu
lado tudo posso.

Agradeço a todos os santos que intercedem a Deus por mim em
especial a **Santa Rita de Cássia** que continua me acolhendo e
iluminando.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora *Professora Dra. Maria da Graça Naclério-Homem*, que há 10 anos me orienta e contribui para a minha formação acadêmica e profissional. Que se tornou amiga para sempre e companheira de todas as horas.

A *Professora Dra. Márcia Martins Marques*, continuo sem palavras para agradecê-la. Mais uma vez permitindo que realizasse essa pesquisa em seu laboratório, estando sempre disponível, com carinho respondendo e me orientando em todas as dúvidas. Também se tornando mais que uma co-orientadora, uma amiga para sempre. A senhora é exemplo a ser seguido por todos os que buscam carreira de professor e pesquisador.

A *Professora Dra. Maria Cristina Zindel Deboni. Cris*, obrigada por continuar me ajudando na elaboração dos artigos e como grande amiga e conselheira. Continuo admirando e me espelhando na sua eficiência, determinação, dedicação e carinho.

A *Dra. Vera Pozzani*. Sempre atenciosa, pronta para ajudar e escutar em todos os momentos. Mais uma amiga que levo para a vida.

Aos amigos da pós-graduação, juntos dividimos dias de muita alegria, outros de nem tanta, celebramos conquistas e vitórias. Aprendemos juntos que trabalho em equipe sempre apresenta melhores resultados.

Em especial ao meu amigo de sempre Alexandre Meireles Borba, Ale você é exemplo de pessoa determinada e produtiva! Obrigada pelo incentivo e colaborações desde sempre!

As todas as minhas amigas do laboratório de cultivo celular com quem passei grande tempo do doutorado, sempre me ajudando com as dúvidas, em especial a Ivana e a Renata, que acabei convivendo mais

tempo durante toda a parte experimental. Não posso deixar de agradecer a todos os meus antigos amigos do laboratório, Sueli, Niltinho (que até nas madrugadas pelo Facebook discutiu resultados comigo), Leila, Cacio, Roberta, Stella, obrigada a todos, juntos construímos uma família.

A Débora pela dedicação e carinho com que cuida do laboratório e dos alunos. Por atender aos telefonemas fora de hora e chegar a vir em um final de semana me “socorrer” no laboratório.

As funcionárias da disciplina de *Cirurgia Cida e Natalia*, todos esses anos de convivência fazem de vocês minhas grandes amigas.

Aos secretários do Departamento, *Edison, Rose* tantos anos juntos e a gente já se entende e se ajuda apenas com olhares e poucas palavras.

Às funcionárias da pós graduação *Alessandra e, Cátia*, 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 *Glaucci Elaine Damasio Fidelis*, por ter mais uma vez me atendido prontamente com tanto carinho e atenção.

As minhas irmãs mais novas Leticia e Lorena, que entenderam minha ausência e me ouviram gritar de alegria quando tudo dava certo e chorar de tristeza quando tudo parecia sem saída! Sempre juntas para o que der e vier! Como disse Lo: “família não se define por sangue”!

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.

A FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelos Auxílios 2011/18921-0 e 2014/07647-2. Sem os quais a realização e divulgação desse trabalho seria impossível.

RESUMO

Brozoski MA. Efeito da laserfototerapia sobre a viabilidade de diferentes tipos celulares em cultura submetidos a diferentes concentrações do alendronato sódico e ácido zoledrônico [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

Os bisfosfonatos (BFs) têm sido amplamente utilizados para o tratamento de doenças do metabolismo ósseo, principalmente na prevenção de metástases ósseas e na prevenção e tratamento da osteoporose. No entanto, existem efeitos colaterais indesejáveis sendo um deles, a indução da Osteonecrose dos Maxilares (*Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws* - MRONJ), uma complicação de difícil tratamento e solução. Até o presente momento, não foi definida a fisiopatologia da MRONJ e nem estabelecido protocolo de tratamento eficaz para esta doença. Diversas terapias vem sendo descritas na literatura para o tratamento da MRONJ dentre elas a laserfototerapia. Assim sendo, os objetivos deste estudo foram: inicialmente avaliar *in vitro* o efeito de diferentes concentrações dos BFs mais empregados na atualidade (alendronato e ácido zoledrônico) na viabilidade de células envolvidas na reparação de lesões MRONJ (osteoblastos e fibroblastos); secundariamente estudar o efeito da fototerapia com laser de baixa potência sobre estas células previamente induzidas pelos BFs. Foram utilizados osteoblastos-símile da linhagem OSTEO 1 e fibroblastos de mucosa bucal humana da linhagem FMM1. Após terem sido submetidos aos testes de citotoxicidade expondo as células as concentrações de 1 μ M, 10 μ M e 100 μ M de alendronato sódico e 3 μ M, 5 μ M e 10 μ M de ácido zoledrônico por 24 horas, os grupos testes foram irradiados com laser de diodo no modo contínuo, puntual e de contato (InGaAlP, 660nm, 30mW, spot 0,028cm²) com duas densidades de energia diferentes 5J/cm² (4,5s) e 10J/cm² (9s). Duas irradiações com intervalo de 6 horas entre cada uma delas foram executadas. A viabilidade celular foi determinada utilizando o ensaio de redução do

MTT, e a atividade de fosfatase alcalina dos osteoblastos foi avaliada utilizando ensaio de ponto final. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística ANOVA 1 critério complementado por Tukey ($p < 0,05$). Foi possível concluir que: as concentrações de 100 μ M e 10 μ M do alendronato sódico foram tóxicas para os osteoblastos e fibroblastos em cultura. As concentrações de 3 μ M, 5 μ M e 10 μ M do ácido zoledrônico foram tóxicas para os osteoblastos e fibroblastos a longo prazo (48h e 72h). A atividade da fosfatase alcalina nos osteoblastos foi afetada por todas as concentrações de ácido zoledrônico testadas (3 μ M, 5 μ M e 10 μ M). Nos parâmetros aqui aplicados a LPT não teve efeito sobre a atividade da fosfatase alcalina das células tratadas com o alendronato de sódio ou ácido zoledrônico. E a laserfototerapia de baixa potência nos parâmetros utilizados nesse estudo não foi capaz de reverter a toxicidade dos bisfosfonatos testados, independentemente das concentrações destas substâncias

Palavras-chave: Osteonecrose Associada a Bifosfonatos, Laser, Alendronato

ABSTRACT

Brozoski MA. Effect of low level laser therapy on viability of different cell types submitted to different concentrations of sodium alendronate and zoledronic acid [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

Bisphosphonates (BPs) have been widely used for treating bone metabolism diseases, especially for prevention of bone metastasis and osteoporosis. However, there are undesirable side effects and one of them, the induction of Osteonecrosis of the Jaw (Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws - MRONJ), a complication of difficult treatment and solution. Until now the pathophysiology and an effective treatment protocol for MRONJ have not been established. Various therapies have been described in the literature for the treatment of MRONJ including laserphototherapy. The objectives of this study were to evaluate the effect of different concentrations of two BPs used today (alendronate and zoledronic acid) on the viability of cells involved in the repair of MRONJ lesions (osteoblasts and fibroblasts); and to study the effect of phototherapy with low power laser on these cells previously treated with referred BPs. After being submitted to cytotoxicity testing by exposing the cells to concentrations of 1 μ M, 10 μ M and 100 μ M of sodium alendronate and 3 μ M, 5 μ M and 10 μ M of zoledronic acid for 24 hours, the test groups were irradiated with diode laser in continuous mode, punctual and contact (InGaAlP, 660nm, 30mW, spot 0,028cm²) with two different energy densities 5 J/cm² (4,5s) and 10J/cm² (9s). Two irradiations with an interval of 6 hours between each of them were performed. Cell viability was determined using the MTT reduction assay, and the alkaline phosphatase activity of osteoblasts was evaluated using the end point assay. The results were submitted to statistical analysis using ANOVA 1 criteria complemented by Tukey (p <0.05). It was possible to conclude that: concentrations of 100 μ M and 10 μ M of alendronate were toxic to osteoblasts and fibroblasts in culture. The concentrations of 3 μ M, 5 μ M and 10 μ M of zoledronic acid

was toxic to osteoblasts and fibroblasts in long-term (48h and 72h). The activity of alkaline phosphatase in osteoblasts was affected by all the zoledronic acid concentrations tested (3 μ M, 5 μ M and 10 μ M). In the LPT parameters applied here had no effect on alkaline phosphatase activity of the cells treated with the sodium alendronate or zoledronic acid. And low power laserphototherapy, in the parameters used in this study, was unable to reverse the toxicity of bisphosphonates tested, irrespective of the concentrations of these substances.

Keywords: Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw ,
Laser, Alendronate

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO LITERATURA	17
2.1 Histórico	17
2.2 Conceito MRONJ	18
2.3 Fisiopatologia MRONJ	20
2.4 Tratamento MRONJ	21
2.5 Estudos <i>in vitro</i>	22
3 PROPOSIÇÃO	24
4 METODOLOGIA	25
4.1 Linhagem Celular	25
4.2 Cultivo Celular	25
4.3 Substâncias Testadas	27
4.4 Grupos Experimentais	27
4.5 Experimento	28
4.5.1 Proliferação Celular	29
4.5.2 Análise Atividade Fosfatase Alcalina	30
4.6 Laserfototerapia	31
4.7 Análise Estatística	33
5 RESULTADOS	34
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXO	58

1 INTRODUÇÃO

Os BFs (bisfosfonatos) vêm sendo utilizados clinicamente desde 1960, para o tratamento de doenças do metabolismo ósseo, como metástases ósseas oriundas principalmente de câncer de pulmão, próstata e mama; mieloma múltiplo; doença de Paget; entre outros (1-3). Atualmente, seu emprego terapêutico tem aumentado principalmente para o tratamento e prevenção de osteoporose e osteopenia(4). Os bisfosfonatos têm sido considerados como a droga mais prescrita para o tratamento da osteoporose no mundo. (3)

A *American Association of Oral and Maxillofacial Surgery* (AAOMS), em 2014, com o surgimento de novas drogas antiresorptivas e antiangiogênicas que também apresentam como efeito adverso a osteonecrose dos maxilares, sugeriram a alteração da nomenclatura de Osteonecrose dos maxilares relacionada a bisfosfonatos (*Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw* BRONJ) por Osteonecrose dos maxilares relacionada a medicação (*Medication-related osteonecrosis of the jaw* MRONJ)(1)

Diversos tipos de tratamento foram propostos na literatura para a MRONJ, dentre eles debridamento cirúrgico, antibioticoterapia(1, 3, 5-9), ozonioterapia(10-12), e laserterapia(13-17).

A laserfototerapia (LPT) vem sendo utilizada clinicamente com sucesso para o tratamento da MRONJ Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram sucesso com diferentes parâmetros de LPT (13, 18-20).

A MRONJ continua sendo uma manifestação recorrente na clínica odontológica de difícil tratamento. A busca pela conscientização da classe médica e odontológica para a prevenção da MRONJ tem evoluído para o controle da doença e diminuição de suas complicações.

Esse trabalho tem como objetivo avaliar in vitro o efeito de diferentes parâmetros de laserfototerapia sobre a viabilidade e proliferação de células envolvidas na osteonecrose em cultura, submetidas a diferentes concentrações de alendronato sódico e ácido zoledrônico

2 REVISÃO LITERATURA

2.1 Histórico

Os bisfosfonatos são utilizados desde 1865 principalmente por sua propriedade anticorrosiva e como agente complexante na indústria têxtil e de fertilizantes. Somente na década de 60 é que os bisfosfonatos passaram a ser utilizados como fármacos para o tratamento de doenças do metabolismo ósseo. (2)

As indicações clínicas para os bisfosfonatos são: tratamento de osteoporose, doença de Paget, metástases ósseas, hipercalcemia provenientes de doenças malignas, mieloma múltiplo, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de pulmão, câncer renal, osteogênese imperfeita (7, 21-27).

O primeiro bisfosfonato utilizado para o tratamento de doenças em humanos foi o etidronato, em 1969 (2). Em 1991 o pamidronato foi aprovado pelo *Food and Drugs Administration* (FDA) para o tratamento da hipercalcemia maligna e em 1995 aprovou o seu uso para o tratamento do mieloma múltiplo. Em 2001 o FDA aprovou o uso do ácido zoledrônico para o tratamento e prevenção de doenças do metabolismo ósseo(3).

Os efeitos adversos mais comuns citados na literatura dos bisfosfonatos administrados por via oral são a inflamação ou infecção do trato gastrointestinal superior(28).

Em 2003 Marx observou 36 pacientes que apresentavam área de necrose em maxila e mandíbula que não reparavam e constatou que todos esses pacientes faziam o uso de bisfosfonatos (pamidronato ou ácido zoledrônico) (29).

No período de 1858 a 1906 a indústria do fósforo teve seu pico de desenvolvimento. Nesse período ocorreu uma epidemia de osteonecrose dos maxilares nos operários dessas indústrias. Essa epidemia é considerada como semelhante a Osteonecrose dos Maxilares por Bisfosfonatos descrita nos dias atuais (30).

Em 2004 a Novartis® fabricante dos bisfosfonatos Fosamax®, Aredia® e Zometa® incluiu na bula desses medicamentos a possibilidade de ocorrência de MRONJ (31).

Recomendações para o tratamento e prevenção da MRONJ vêm sendo publicados por entidades de classe desde 2006 [2, 4, 7, 24]. A tabela apresentada pela *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* (AAOMS) publicada em 2009 e revista em 2014 está representada no quadro 2.1

2.2 Conceito da MRONJ

A MRONJ foi conceituada pela AAOMS como sendo uma área de exposição óssea na maxila ou mandíbula, que não repara em oito semanas, em pacientes que estão recebendo ou que receberam drogas antiresorptivas ou antiangiogênicas sistemicamente, não receberam radioterapia na maxila ou mandíbula, e não apresentem sinais óbvios de metástase nos maxilares(1).

Estágio e Conduta perante MRONJ		
Estágio	Apresentação clínica	Conduta
Em risco	Sem exposição óssea	Nenhum tratamento indicado Orientações ao paciente
0	Sem evidência clínica de necrose, mas com presença de sintomas inespecíficos como odontalgia, dor região mandibular irradiada para articulação temporomandibular, dor região sinusal. Ou com perda dentária não associada a periodontite crônica, fístula periodontal ou periapical não associada a necrose pulpar. Regiões de esclerose óssea detectadas radiograficamente envolvendo o osso alveolar. Alteração da lâmina dura, menos espessa e diminuição do espaço do ligamento periodontal.	Controle sistêmico com uso de analgésicos e alguns casos antibióticos.
1	Exposição óssea assintomática ou fístula com sondagem em direção ao tecido ósseo. Sem evidência de infecção. Com mesmos achados radiográficos do estágio 0	Orientações ao paciente, bochechos com soluções antibacterianas, e acompanhamento criterioso com retornos trimestrais. Rever a necessidade da continuação do uso da medicação (bisfosfonatos, denosumab, antiangiogênica)
2	Exposição óssea assintomática ou fístula com sondagem em direção ao tecido ósseo. Com evidência de infecção. Geralmente são pacientes sintomáticos. Com mesmos achados radiográficos do estágio 0	Orientações ao paciente, bochechos com soluções antibacterianas, antibioticoterapia, analgesia, 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, antibioticoterapia, analgesia, cirurgias paliativas e acompanhamento criterioso

Quadro 2.1 - Estadiamento e Estratégias de tratamento para MRONJ. Adaptado de Ruggiero, S.L., et al., *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw-2014 Update*. Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, 2014. 72(10): p. 1938-1956.(1)

2.3 Fisiopatologia da MRONJ

A fisiopatologia da MRONJ ainda não foi totalmente elucidada (1, 32, 33).

Os bisfosfonatos apresentam dois efeitos biológicos fundamentais: inibição da calcificação, quando administrados em altas doses, e inibição da reabsorção óssea. Atuam por meio de dois mecanismos de ação relacionados com atividade antiosteoclástica e antiangiogênica (34).

Os compostos nitrogenados apresentam atividade antiangiogênica, diminuição do fator de crescimento endotelial e com isso diminuem a vascularização óssea, podendo contribuir para o desenvolvimento da osteonecrose (35).

A literatura relata que o risco da MRONJ pode ser potencializado com o uso concomitante de corticosteróides e quimioterápicos (26).

Em um estudo retrospectivo em 2005 Miglioratti et al, descreveram uma revisão de dezoito casos de MRONJ de pacientes que faziam o uso de pamidronato, ácido zoledrônico ou alendronato. Apenas dois pacientes desenvolveram a doença espontaneamente, o restante estava associado à extração dentária, infecção ou trauma (21).

O diagnóstico de MRONJ é primeiramente baseado na história e exame clínico do paciente. Pacientes apresentando exposição óssea necrótica, variando de poucos milímetros a áreas maiores, podem 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 (36).

A osteonecrose apresenta maior incidência na mandíbula em comparação com a maxila em uma proporção de 2:1, e áreas com

mucosa menos espessa, como proeminências ósseas, tórus e linha milióidea. A quantidade de osso exposta pode ser pequena ou grande, começando com uma exposição pontual que pode permanecer assim ou progredir para uma exposição maior (23, 37-39).

2.4 Tratamento MRONJ

Não existe um protocolo definido para o tratamento da MRONJ, os trabalhos publicados são baseados na experiência dos profissionais. Os autores consultados apresentam diversas formas para o tratamento da MRONJ, dentre elas podemos citar antibioticoterapia prolongada, uso de anti-sépticos orais como clorexidina 0,12%, debridamento superficial, laserfototerapia, uso de ozônio (16, 17, 40-43).

Alguns estudos utilizando laserfototerapia para o tratamento da MRONJ demonstraram bons resultados. Vescovi et al., em 2007, realizaram um estudo com o uso de laser de Nd: YAG para o tratamento de MRONJ e concluíram que o uso do laser, associado ou não ao procedimento cirúrgico, apresentou melhores resultados clínicos (17). Adicionalmente, Martins ET al., em 2011(13), demonstraram que em 86% dos casos de MRONJ tratados com a associação de laserfototerapia ao tratamento com medicamentos e cirurgia houve reparação das lesões, enquanto somente 40% repararam quando tratados somente com medicamentos e cirurgia (44).

Scolleta e colaboradores em 2010 avaliaram a eficácia clínica da laserfototerapia para o tratamento da MRONJ. Avaliaram 20 pacientes afetados por MRONJ, que receberam bioestimulação com um laser infravermelhos 904 nm. Observaram que a laserfototerapia foi benéfica para os pacientes, reduzindo dor, controlando edema, e diminuindo a quantidade de secreção purulenta presente nas lesões (45).

A dor relatada por pacientes apresentando MRONJ pode ser controlada com o uso de laser de baixa potência. Romeo et al. (42), avaliaram doze pacientes apresentando quadro de MRONJ os quais 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 à re-infecção da área necrótica.

A fototerapia com laser em baixa intensidade (FTLBI) tem demonstrado capacidade de modular o metabolismo celular. Alguns estudos *in vitro* demonstraram que a FTLBI pode acelerar o crescimento de fibroblastos, osteoblastos e células endoteliais (46-51).

2.5 Estudos *in vitro*

A viabilidade e proliferação de osteoblastos e fibroblastos após contato com alendronato sódico foi observada por Brozoski em 2011 (52). Nesse estudo o alendronato sódico foi citotóxico para os osteoblastos e fibroblastos em cultura dependendo de sua concentração, sendo que os fibroblastos foram menos sensíveis a concentrações maiores da droga que os osteoblastos. Em concentrações maiores que 10^{-5}M o alendronato sódico inibiu a capacidade proliferativa de osteoblastos em cultura(52).

A citotoxicidade do alendronato sódico foi demonstrada por Moreira e colaboradores em 2005 em um estudo "*in vitro*" com cultura de células endoteliais e detectaram que esta medicação apresentou alta toxicidade. No mesmo estudo realizaram avaliação "*in vivo*" em tecido subcutâneo de ratos após implantação de um tubo de polietileno contendo alendronato em forma de pasta e observaram presença de

grande quantidade de tecido de granulação, com infiltrado inflamatório, áreas de necrose tecidual, atingindo inclusive tecido muscular (53).

Trabalhando com fibroblastos do ligamento periodontal em cultura, Correia et al.(54), demonstraram que o alendronato sódico é citotóxico para estas células a partir da concentração de 10^{-6} M.

Basso e colaboradores em 2013 avaliaram o efeito do ácido zoledrônico sobre células epiteliais humanas e fibroblastos gengivais. Observaram que o ácido zoledrônico na concentração de $5\mu\text{M}$ foi citotóxico para os tipos celulares testados, provocando redução significativa no número de células viáveis e diminuindo a atividade metabólica de ambas as linhas celulares (55).

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar comparativamente o efeito de diferentes parâmetros de laserfototerapia sobre a viabilidade e proliferação de células envolvidas na osteonecrose em cultura, submetidas a diferentes concentrações de alendronato sódico e ácido zoledrônico.

4 METODOLOGIA

Após aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa da FOUSP, (Parecer 280.024 - Anexo A) os experimentos foram realizados no laboratório de Pesquisas Básicas “Edmir Matson” do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

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 (56) e a linhagem FMM1 de fibroblastos de mucosa bucal humana (57), cedidas pelo laboratório de Pesquisas Básicas “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, crioprotegidas em dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) foi descongelado em banho Maria a 37°C (Fanem, SP, Brasil) por 1 minuto. Para remover o DMSO, as células em suspensão foram transferidas para um tubo de centrifugação contendo 10 ml de Dulbecco`s Modified Eagle Médium (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 Chemical, St Louis, MO, EUA) e foi 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.

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.

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 - Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA), pH7,2. A seguir, as células foram separadas com 2ml de solução de tripsina a 0,25% (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) 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 ressuspendido 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 passagens.

4.3 Substâncias Testadas

As substâncias utilizadas para a realização dos experimentos foram:

- Alendronato Sódico a 99% (Fórmula e Ação, São Paulo, SP, Brasil), apresentando peso molecular de 325,12 g/mol e fórmula química $C_4H_{12}NNaO_7P_2 \cdot 3H_2O$.

- Ácido Zoledrônico (Zometa[®] - Novartis Pharma Stein AG, Stein, Suíça) apresentando peso molecular de 272.08g/mol e fórmula química $C_5H_8N_2Na_2O_7P_2 \cdot 4H_2O$.

4.4 Grupos Experimentais

Os grupos experimentais foram:

Controle Positivo: Células (Osteo-1 ou FMM1) crescidas nas condições ideais.

Controle Negativo: Células (Osteo-1 ou FMM1) crescidas em meio contendo diferentes concentrações de Alendronato Sódico (1 μ M, 10 μ M ou 100 μ M) ou Ácido Zoledrônico (3 μ M, 5 μ M ou 10 μ M)

Laser 5J/cm²: Células (Osteo-1 ou FMM1) crescidas em meio contendo diferentes concentrações de Alendronato Sódico (1 μ M, 10 μ M

ou 100 μ M) ou Ácido Zolendrônico (3 μ M, 5 μ M ou 10 μ M) e irradiadas com densidade de energia de 5J/cm²

Laser 10J/cm²: Células (Osteo-1 ou FMM1) crescidas em meio contendo diferentes concentrações de Alendronato Sódico (1 μ M, 10 μ M ou 100 μ M) ou Ácido Zolendrônico 3 μ M, 5 μ M ou 10 μ M) e irradiadas com densidade de energia de 10J/cm²

4.5 Experimento

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

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 foi dispensada em um tubo de ensaio, onde foram adicionados 0,8ml de PBSA e 0,1ml de Azul de Trypan (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) a 0,4%. Posteriormente essa mistura foi transferida 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 a possibilitar a obtenção de 1000 células em cada 100 μ l, conforme metodologia descrita por Freshney em 2010 (58). Tal suspensão de células foi plaqueada em placas de 48 poços distribuindo 500 células para cada poço em cada grupo experimental (Figura 4.1).

Para garantir homogeneidade na distribuição das células entre os poços foi utilizado um pipetador multicanal.

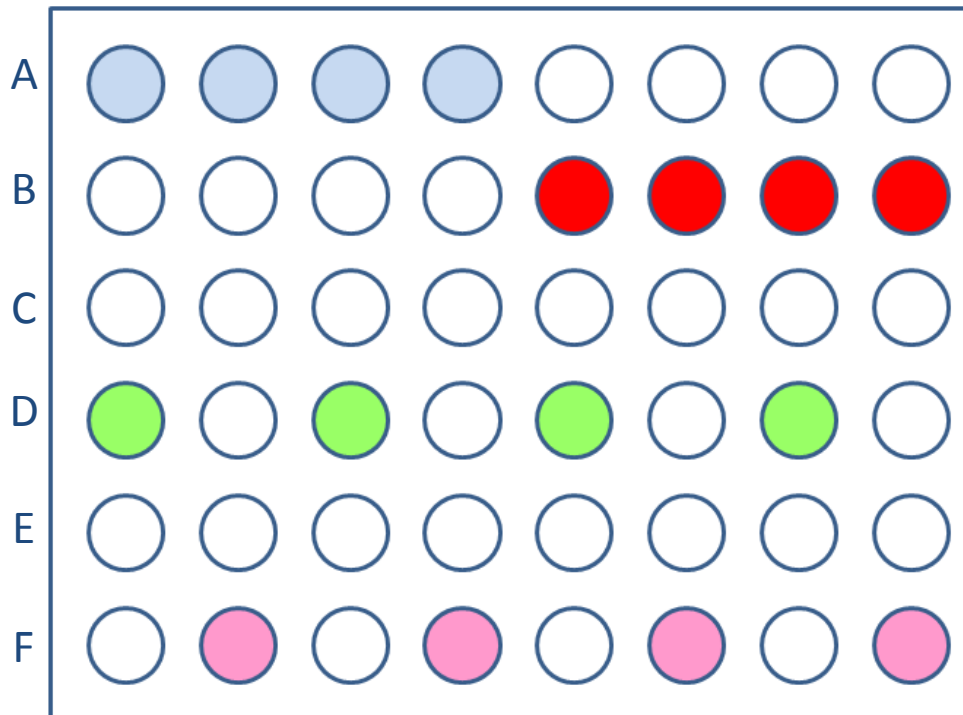


Figura 4.1– Representação esquemática da placa de cultivo celular. Cada cor representa um grupo experimental (azul – controle; vermelho – controle negativo; verde laser 5J; rosa laser 10J)

4.5.1 Proliferação Celular

Para análise da proliferação celular foi observado o crescimento celular, em 3 períodos, tratadas com todas as concentrações do alendronato sódico (100 μ M, 10 μ M e 1 μ M) e ácido zoledrônico (3 μ M, 5 μ M e 10 μ M) estudados.

Os dados do teste de redução do MTT (*MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) obtidos em 24, 48 e 72 horas foram utilizados para a construção de curvas de crescimento celular.

Para a realização destas curvas foram plaqueadas 4 placas de 48 poços (500 células por poço) uma para cada tempo experimental de 24, 48 e 72 horas. Em cada placa foram semeadas 4 réplicas de cada grupo experimental (4 grupos), totalizando 16 poços por placa.

A primeira placa de 48 poços foi analisada pelo teste do MTT 24 horas após as células em contato com meio condicionado por 24 horas terem recebido a laserfototerapia. 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, as placas de 48 horas foi submetida ao teste do MTT e as placas de 72 horas tiveram novamente metade dos seus meios substituídos por meio de cultura fresco para serem submetidas ao teste do MTT 24 horas depois.

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

4.5.2 Análise Atividade Fosfatase Alcalina

A atividade de fosfatase alcalina foi realizada no período de 7 (sete) dias com os osteoblastos após a última irradiação, seguindo protocolo do Kit de Fosfatase Alcalina – Ensaio de Ponto Final (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). Este ensaio utiliza o substrato de timolftaleína monofosfato, um substrato do éster do ácido fosfórico. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro com filtro de 590 nm.

A atividade de fosfatase alcalina foi calculada multiplicando-se a absorvância do teste pelo fator de calibração. Em seguida, os valores obtidos deverão ser normalizados pelo valor do padrão, dividindo-se o valor da ALP pelo valor obtido com o padrão [U/(Lxmg)].

4.6 Laserfototerapia

Todos os procedimentos com o equipamento laser foram realizados seguindo todas as normas de segurança NBR/IEC 601.2.22 (59).

As células foram irradiadas após sofrerem o contato com as substâncias testadas de acordo com os tempos pré-estabelecidos para a análise da proliferação celular.

Foi utilizado o Laser de Baixa Potência (Photon Lase, DMC Equipamentos LTDA, São Carlos, SP, Brasil), com os seguintes parâmetros:

-comprimento de onda: 660nm (meio ativo InGaAlP) = laser vermelho

-área do spot: 0,028cm²

-potência: 30mw

-densidade de energia: 5J/cm² ou 10J/cm²

-tempo de irradiação por ponto: 4,5s ou 9s, respectivamente

-energia por ponto: 0,08J ou 0,14J

-densidade de potência: 0,714W/cm²

Foi utilizado um medidor de potência *power meter* (PowerMax, Coherent, EUA) para verificação da saída de potência do equipamento, antes e após as irradiações.

As irradiações das culturas celulares previamente tratadas pelas substâncias estudadas foram realizadas dentro da capela de fluxo laminar, posicionando-se a peça de mão do equipamento laser em contato com o fundo das placas de cultura celular. (Figura 4.2)

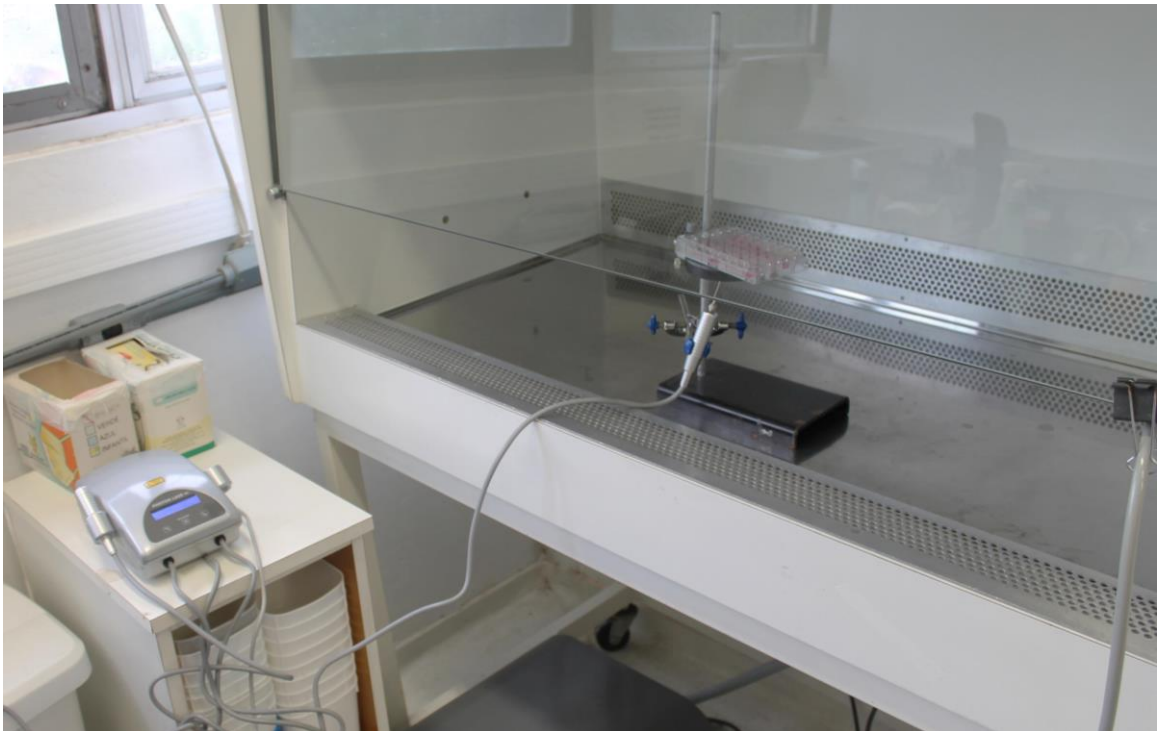


Figura 4.2 – Ilustração da irradiação de células em placas de cultivo dentro do fluxo laminar

Para os experimentos de proliferação celular a irradiação foi realizada no modo pontual, em contato em um único ponto no centro de cada poço da placa de Petri de 48 poços. A peça de mão foi fixada em suporte para que a distância fosse mantida de maneira constante. Foram realizadas 2 irradiações com intervalo de 6 horas.(Figura 4.3)

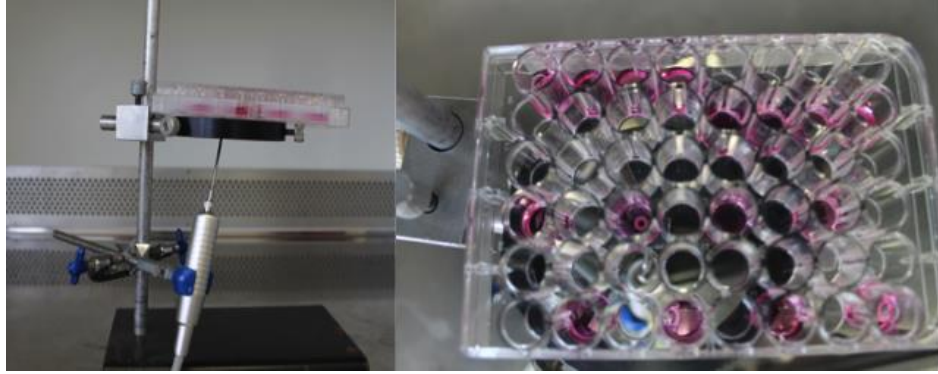


Figura 4.3 – Ilustração da irradiação das células em placas de cultivo

As placas que não sofreram irradiação (controles) receberam os mesmos tratamentos experimentais das placas irradiadas simulando cada passo da aplicação do laser em baixa intensidade anteriormente descrito, porém sem que o equipamento de laser fosse ligado.

4.7 Análise Estatística

Os resultados dos testes de citotoxicidade, e atividade de fosfatase alcalina foram analisados pelo método ANOVA – 1 critério, complementado pelo teste de Tukey. Foi utilizado o programa estatístico BioEstat versão 5.0; adotado valor de $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

Os resultados do teste de redução do MTT serão apresentados em função dos tipos celulares e das substâncias testadas:

- 1- Alendronato e Osteo-1
- 2- Alendronato e FMM1
- 3- Ácido Zoledrônico e Osteo-1
- 4- Ácido Zoledrônico e FMM1.

Em seguida serão apresentados os resultados do teste de fosfatase alcalina.

1- Alendronato e Osteo-1

Os resultados obtidos dos 4 grupos experimentais quando os osteoblastos em cultura (linhagem OSTEO1) foram cultivadas em meio contendo alendronato sódico nas suas diferentes concentrações estão representados nos gráficos de 5.1 a 5.3. Os osteoblastos tratados com alendronato sódico nas concentrações 100 μ M e 10 μ M (Gráficos 5.1 e 5.2, respectivamente) apresentaram redução significativa da viabilidade celular quando comparados ao grupo controle ($p < 0,01$), independentemente de terem sido ou não irradiados.

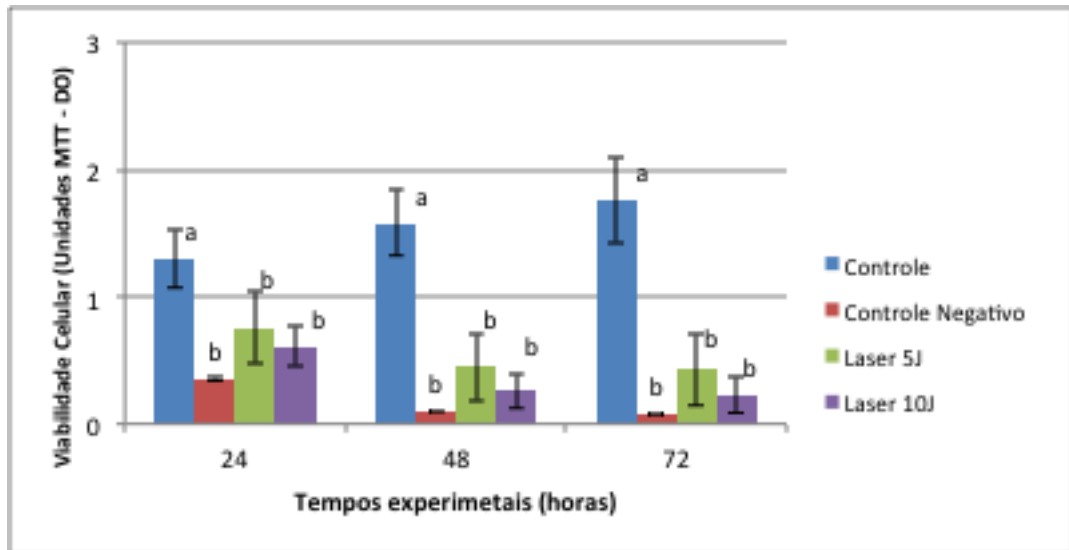


Gráfico 5.1 – Representação gráfica da viabilidade celular de osteoblastos linhagem OSTEOP1 – submetidos ao alendronato sódico na concentração de 100µM. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos dentro do mesmo tempo experimental ($p < 0,01$)

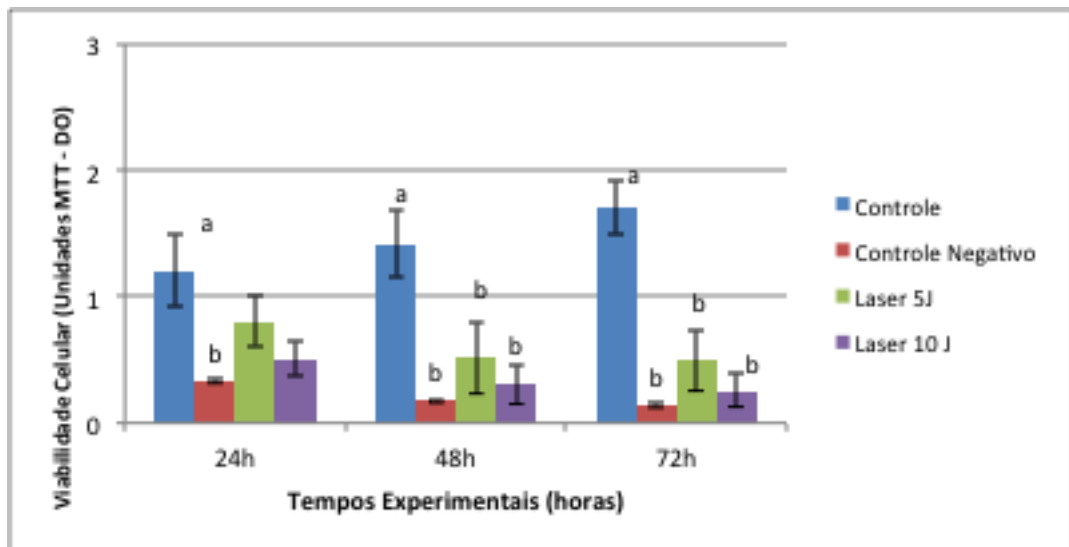


Gráfico 5.2 – Representação gráfica da viabilidade celular de osteoblastos linhagem OSTEOP1 – submetidos ao alendronato sódico na concentração de 10µM. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos dentro do mesmo tempo experimental ($p < 0,01$)

Os osteoblastos tratados com alendronato sódico na concentração de 1µM mostraram viabilidade celular semelhantes ($p > 0,05$) independentemente dos grupos experimentais (Gráfico 5.3)

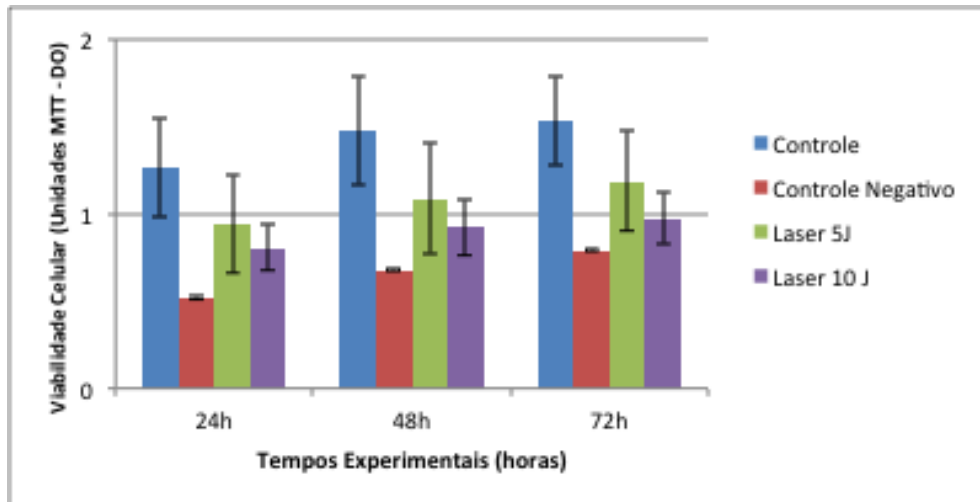


Gráfico 5.3 – Representação gráfica da viabilidade celular de osteoblastos linhagem Osteo1 – submetidos à concentração de $1\mu\text{M}$ de alendronato sódico. Não houve diferença significativa entre os grupos dentro do mesmo tempo experimental ($p>0,05$)

2 - Alendronato e FMM1

Os resultados obtidos dos 4 grupos experimentais quando os fibroblastos em cultura (linhagem FMM1) foram cultivadas em meio contendo alendronato sódico nas suas diferentes concentrações estão representados nos gráficos de 5.4 a 5.6. Os fibroblastos tratados com alendronato sódico nas concentrações $100\mu\text{M}$ e $10\mu\text{M}$ (gráficos 5.4 e 5.5, respectivamente) apresentaram redução significativa da viabilidade celular quando comparados ao grupo controle ($p<0,01$), independentemente de terem sido ou não irradiados.

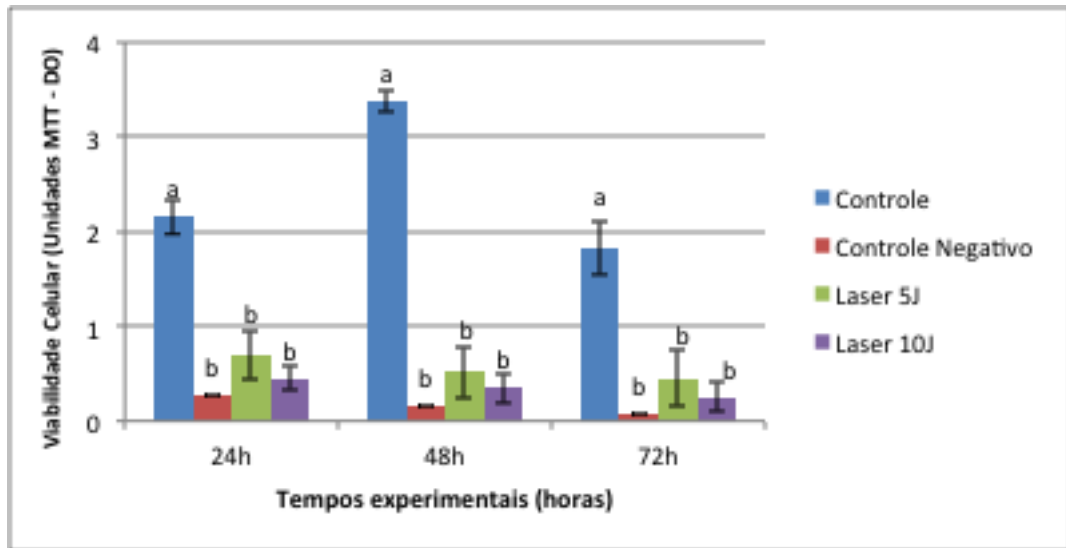


Gráfico 5.4 – Representação gráfica da viabilidade celular de fibroblastos linhagem FMM1 – submetidos ao alendronato sódico na concentração de 100µM. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos dentro do mesmo tempo experimental ($p < 0,01$)

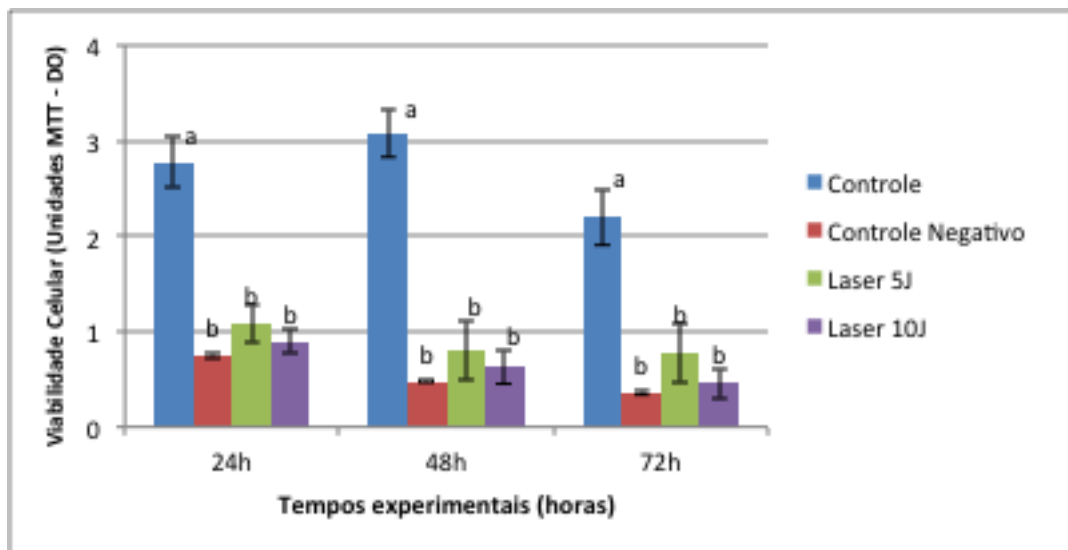


Gráfico 5.5 – Representação gráfica da viabilidade celular de fibroblastos linhagem FMM1 – submetidos ao alendronato sódico na concentração de 10µM. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos dentro do mesmo tempo experimental ($p < 0,01$)

Na presença do alendronato sódico na concentração de 1µM a viabilidade celular dos fibroblastos foi semelhante entre todos os grupos experimentais, exceto pelo grupo tratado com laser 10J em 48 horas. Neste período a viabilidade celular deste grupo foi

significativamente menor que as dos demais grupos experimentais ($p < 0,01$) (Gráfico 5.6)

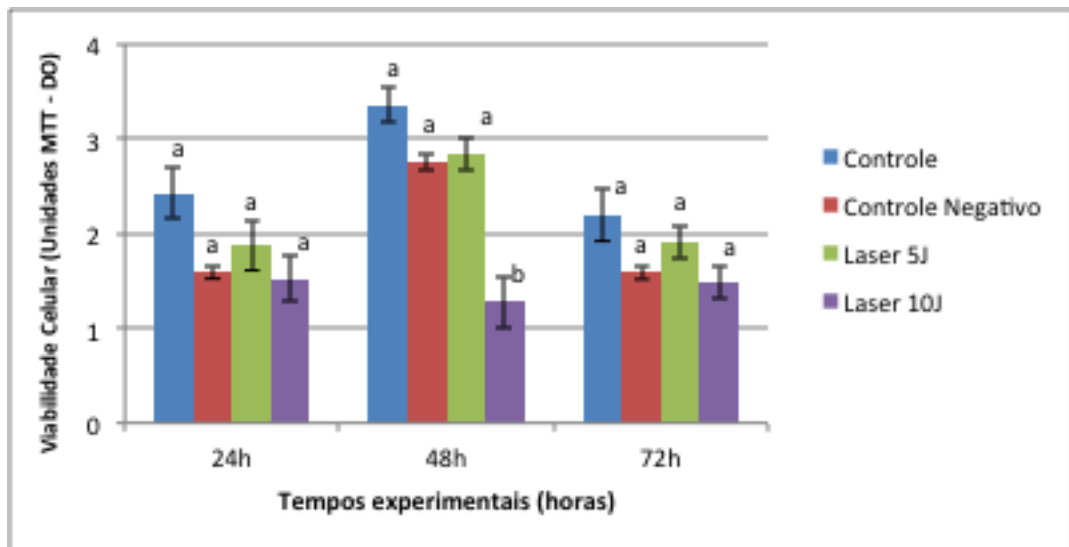


Gráfico 5.6 – Representação gráfica da viabilidade celular de fibroblastos linhagem FMM1 – submetidos ao alendronato sódico na concentração de $1\mu\text{M}$. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos dentro do mesmo tempo experimental ($p < 0,01$)

3 – Ácido Zoledrônico e OSTE01

Os resultados obtidos dos 4 grupos experimentais quando os osteoblastos em cultura (linhagem OSTE01) foram cultivadas em meio contendo ácido zoledrônico nas suas diferentes concentrações estão representados nos gráficos de 5.7 a 5.9.

Os osteoblastos tratados com ácido zoledrônico na concentração de $3\mu\text{M}$ (gráfico 5.7) apresentaram redução significativa ($p < 0,01$) da viabilidade celular quando comparado ao grupo controle independente de terem sido irradiados no tempo de 48h. Em 72 horas os grupos controle negativo e laser 5J apresentaram diferença significativa ($p < 0,01$) em relação aos grupos controle e laser 10J.

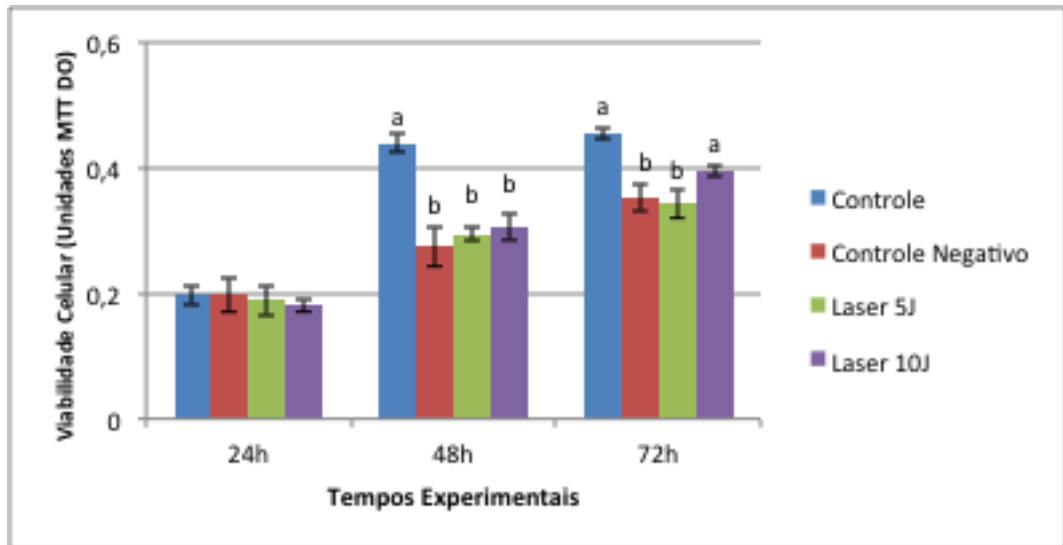


Gráfico 5.7 – Representação gráfica da viabilidade celular de osteoblastos linhagem OSTEO1 – submetidos ao ácido zoledrônico à concentração de 3µM. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos dentro do mesmo tempo experimental ($p < 0,01$)

Os osteoblastos tratados com ácido zoledrônico na concentração de 5µM mostraram diferença significativa na viabilidade celular ($p < 0,01$) nos grupos controles e demais grupos independentemente de terem sido irradiados ou não nos tempo de 48h e 72h. (Gráfico 5.8)

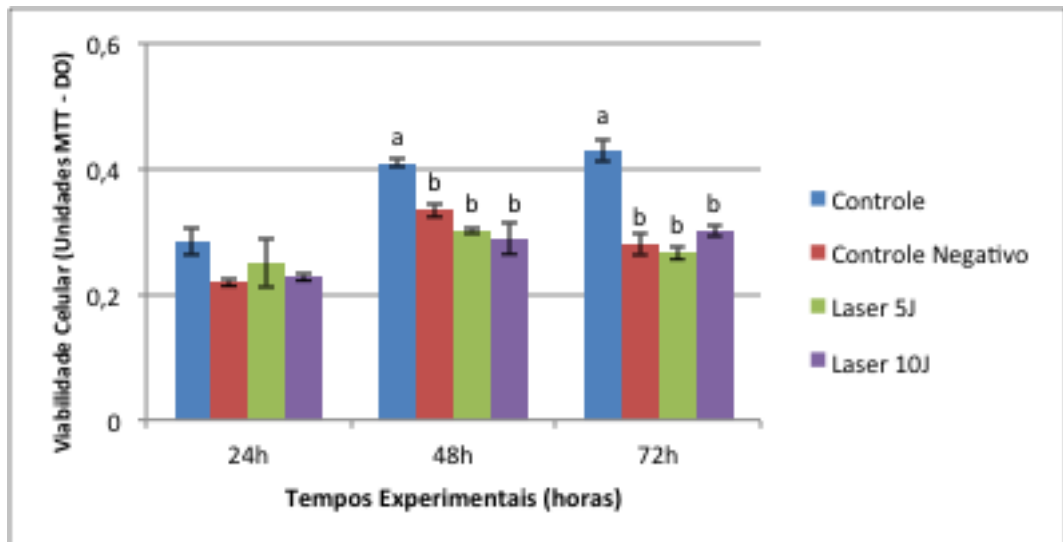


Gráfico 5.8 – Representação gráfica da viabilidade celular de osteoblastos linhagem OSTEO1 – submetidos ao ácido zoledrônico à concentração de 5µM. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos dentro do mesmo tempo experimental ($p < 0,01$)

Os osteoblastos tratados com ácido zoledrônico na concentração de $10\mu\text{M}$ mostraram diferença significativa na viabilidade celular ($p < 0,05$) nos grupos controles e controle negativo em 48h com relação aos grupos irradiados independente do parâmetro utilizado para a irradiação. No tempo de 72h houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre o grupo controle e os demais grupos independentemente de terem sido irradiados ou não. (Gráfico 5.9)

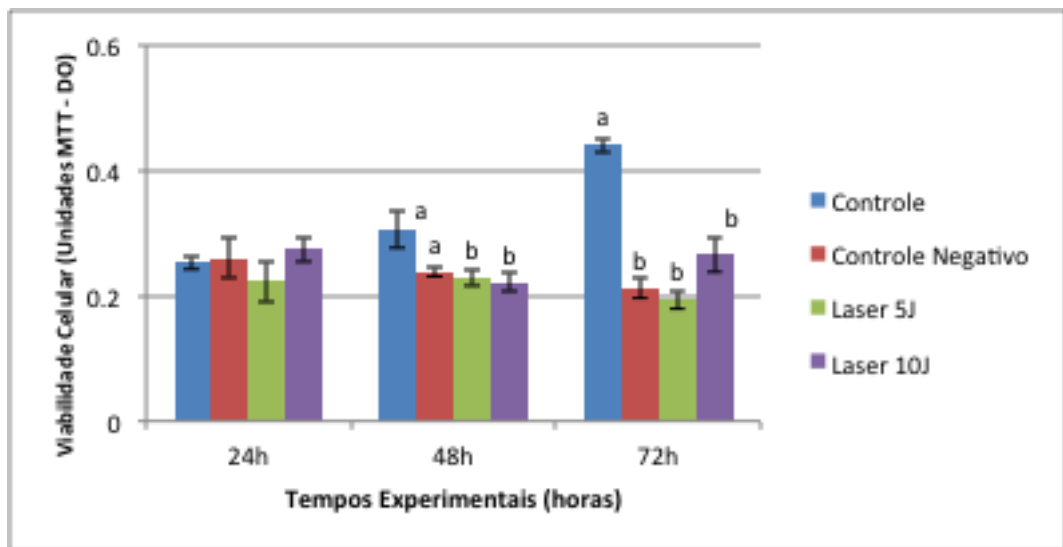


Gráfico 5.9 – Representação gráfica da viabilidade celular de osteoblastos linhagem OSTEO1 – submetidos ao ácido zoledrônico à concentração de $10\mu\text{M}$. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos dentro do mesmo tempo experimental. ($p < 0,05$)

4 – Ácido Zoledrônico e FMM1

Os resultados obtidos dos 4 grupos experimentais quando os fibroblastos em cultura (linhagem FMM1) foram cultivados em meio contendo ácido zoledrônico nas suas diferentes concentrações estão representados nos gráficos de 5.10 a 5.12.

Os fibroblastos tratados com ácido zoledrônico na concentração de $3\mu\text{M}$ (gráfico 5.10) apresentaram redução significativa da viabilidade celular quando comparado ao grupo controle independente de terem sido irradiados ou não apenas no tempo de 72 horas ($p < 0,01$).

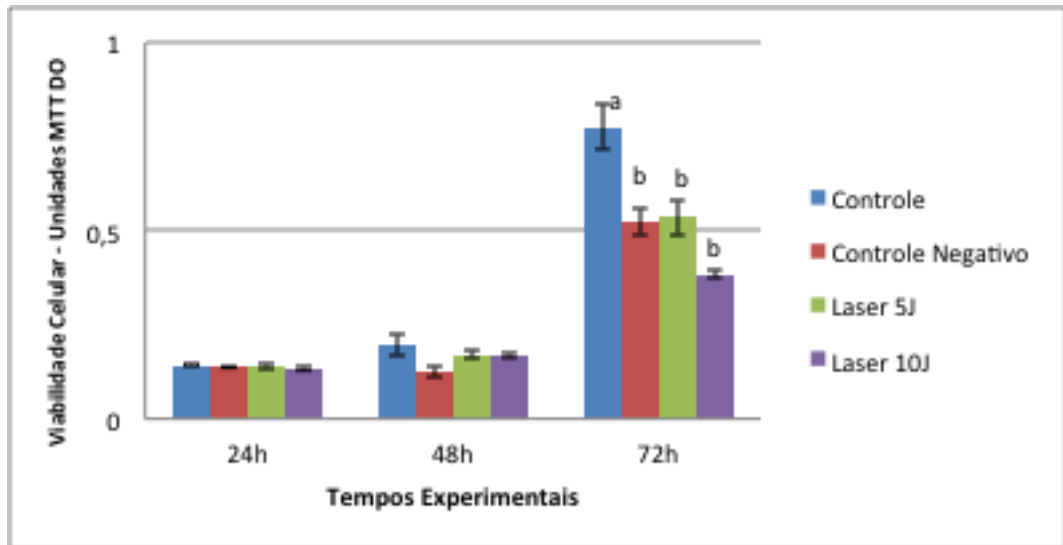


Gráfico 5.10 – Representação gráfica da viabilidade celular de fibroblastos linhagem FMM1 – submetidos ao ácido zoledrônico à concentração de 3µM. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos dentro do mesmo tempo experimental ($p < 0,01$)

Os fibroblastos tratados com ácido zoledrônico na concentração de 5µM (gráfico 5.11) apresentaram redução significativa ($p < 0,01$) da viabilidade celular quando comparado ao grupo controle no tempo de 72 horas. O grupo irradiado com laser 10J no tempo de 72 horas apresentou diferença significativa ($p < 0,01$) em relação ao grupo controle negativo (não irradiado).

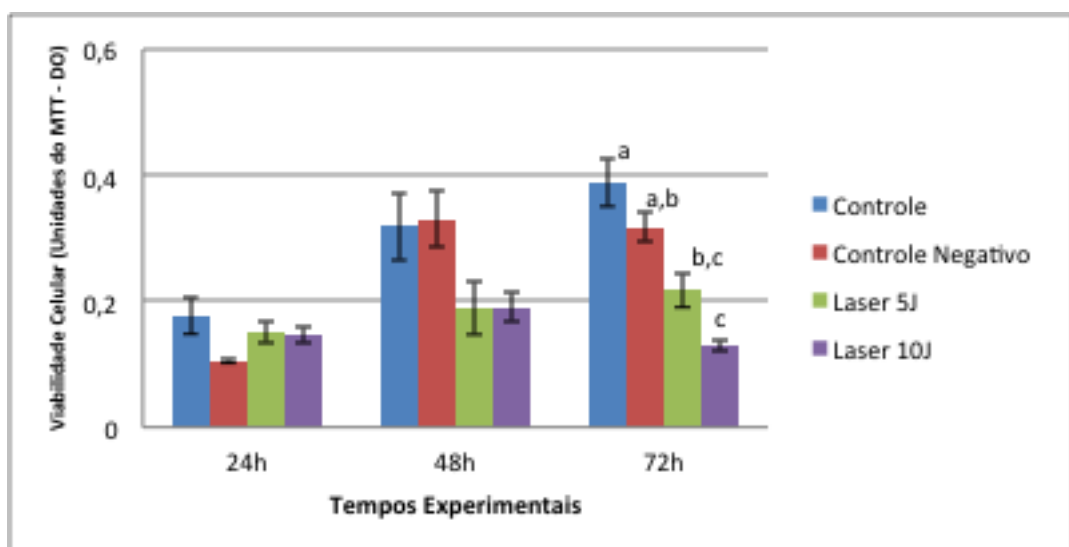


Gráfico 5.11 – Representação gráfica da viabilidade celular de fibroblastos linhagem FMM1 – submetidos ao ácido zoledrônico à concentração de 5µM. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos dentro do mesmo tempo experimental ($p < 0,01$)

Os fibroblastos tratados com ácido zoledrônico na concentração de $10\mu\text{M}$ mostraram diferença significativa na viabilidade celular ($p < 0,05$) nos grupos controles e demais grupos independentemente de terem sido irradiados ou não nos tempos de 48h e 72h. (Gráfico 5.12)

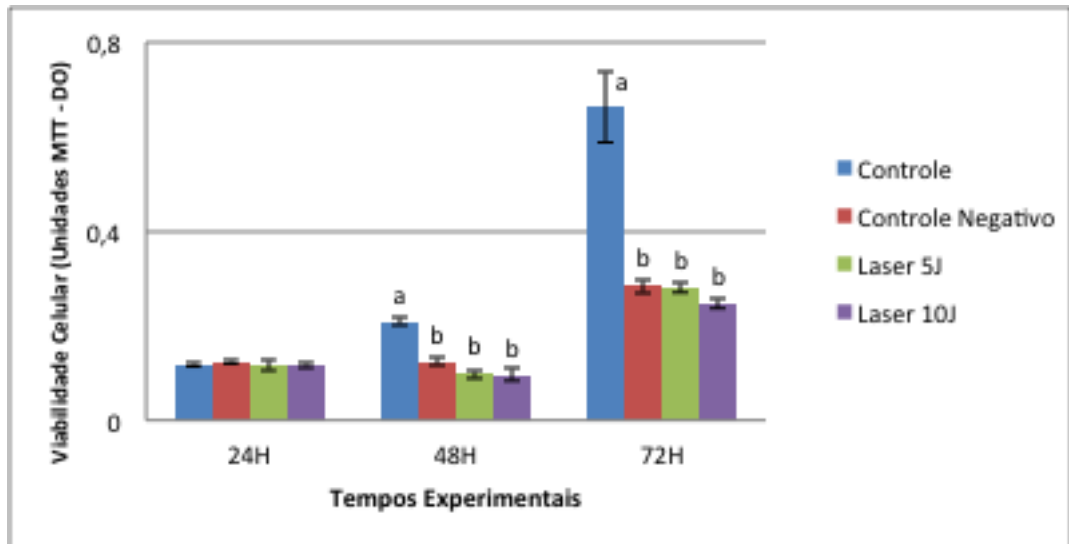


Gráfico 5.12 – Representação gráfica da viabilidade celular de fibroblastos linhagem FMM1 – submetidos ao ácido zoledrônico à concentração de $10\mu\text{M}$. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos dentro do mesmo tempo experimental ($p < 0,01$)

Atividade da Fosfatase Alcalina

Os dados da atividade da fosfatase alcalina em 7 dias, após a última irradiação, foram transformados em porcentagem em relação a média do controle que foi considerado 100%.

Observamos redução significativa ($p < 0,01$) na expressão da fosfatase alcalina para os grupos que receberam o ácido zoledrônico em todas as concentrações testadas (3, 5 e $10\mu\text{M}$) independente de terem sido irradiados ou não.

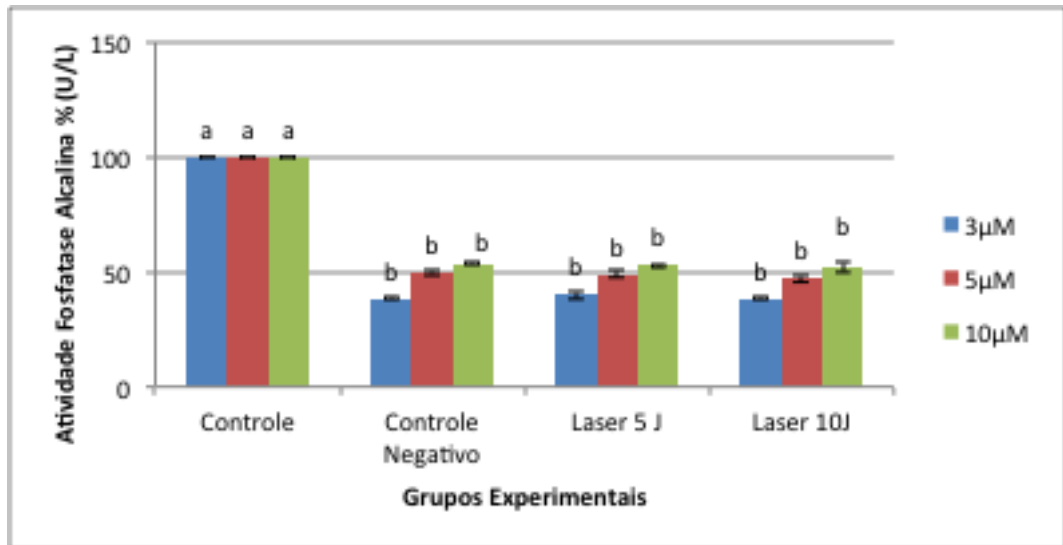


Gráfico 5.13 – Representação gráfica da ALP para o ácido zoledrônico em 7 dias nos diferentes períodos e grupos testados ($p<0,01$)

Observamos redução significativa ($p<0,01$) na expressão da fosfatase alcalina para os grupos que receberam o alendronato sódico nas concentrações 100µM e 1µM independente de terem sido irradiados ou não. Na concentração de 10µM observamos diferença significativa ($p<0,01$) no grupo que recebeu laser 5J com relação aos demais grupos (controle, controle negativo e laser 10J).

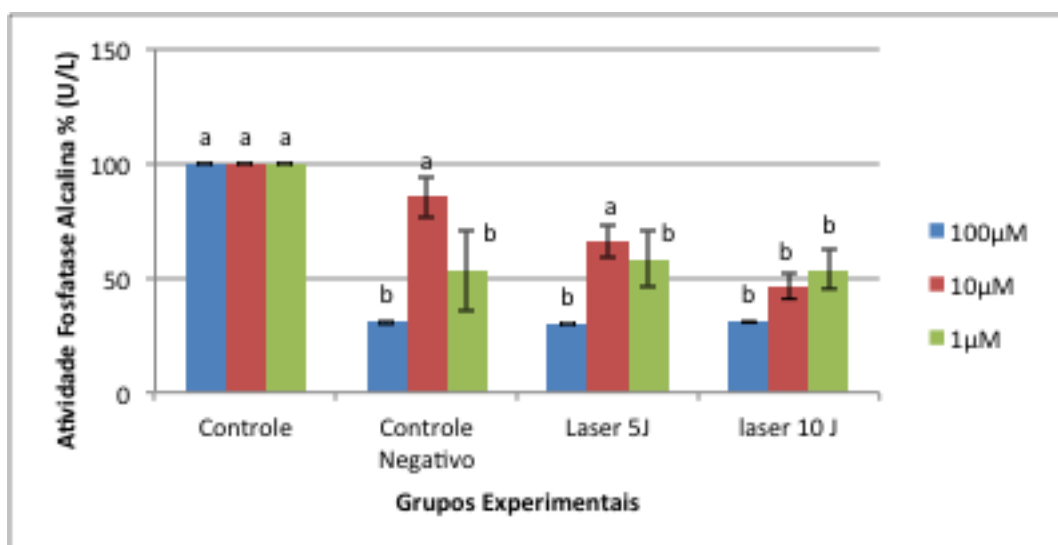


Gráfico 5.14 – Representação gráfica da ALP para o alendronato sódico em 7 dias nos diferentes períodos e grupos testados ($p<0,01$)

6 DISCUSSÃO

Desde a primeira publicação em 2003 relatando a osteonecrose induzida por bisfosfonatos (29) o assunto continua em voga, tendo grande repercussão na comunidade científica; porém inúmeras perguntas continuam sem resposta.

Até o presente momento o mecanismo exato de como essa classe de medicamento atua para o desenvolvimento da osteonecrose ainda não foi estabelecido. Sabe-se que o tipo de medicação, o tempo de uso e a via de administração são fatores que influenciam na MRONJ (32, 60). Alguns autores citam que a citotoxicidade da droga seja um dos fatores para o desenvolvimento da osteonecrose (33). Outros apontam que a microbiota local seja fator determinante para o aparecimento da lesão (61-63). A associação entre a alteração do metabolismo ósseo, a citotoxicidade, a diminuição da angiogênese, a microbiota e o constante microtrauma que acomete a cavidade bucal são os fatores mais citados na fisiopatologia da MRONJ (1).

A citotoxicidade dos bisfosfonatos vem sendo demonstrada por diferentes estudos in vitro, onde a concentração da medicação, o tipo celular, o tempo de contato com a droga influenciam no efeito tóxico sobre as células (33, 64, 65). As concentrações do alendronato sódico e ácido zoledrônico utilizadas foram baseadas em estudos prévios (52, 66). Utilizamos concentrações altas das drogas (Alendronato sódico - 100µm, 10µm – e Ácido zoledrônico, 5µm e 10µm) para submeter as células ao máximo desafio de toxicidade.

Até o presente momento não existe consenso na literatura com relação a protocolos de tratamento para MRONJ. Diversos tipos de condutas são empregadas, desde apenas acompanhamento clínico, antibioticoterapia, até grandes ressecções de maxila e mandíbula (1, 5, 7, 8, 67). O uso da ozonioterapia (10, 11) assim como laserfototerapia

(13-15, 18, 68) vem sendo apresentado como alternativas para o tratamento da MRONJ.

O uso do laser tem apresentado sucesso no tratamento da MRONJ. Em procedimentos cirúrgicos, a utilização do laser de alta potência, onde a área necrótica é removida com o auxílio do laser tem apresentado resultados promissores (15, 68-71). A laserfototerapia com laser de baixa potência tanto vermelho quanto infravermelho também vem sendo aplicada com resultados positivos nos casos de MRONJ (13, 14, 16-18, 71, 72).

Sabe-se que a laserfototerapia apresenta inúmeros benefícios como modulação do processo inflamatório, aceleração da reparação tecidual, e que também favorece a angiogênese e promove analgesia (51, 73). Fatores esses importantes para que a laserfototerapia seja considerada promissora para o tratamento da MRONJ.

Em estudo realizado por Góralczyk e colaboradores em 2014 foi observado que as células endoteliais tiveram sua proliferação aumentada quando irradiadas com laser (74). Clinicamente, os autores sugerem que a laserfototerapia, para o tratamento da MRONJ, apresenta resultados positivos por esse aumento da angiogênese (13, 14, 17).

Estudos clínicos utilizam parâmetros diversos vermelho e infravermelho com sucesso para o tratamento da MRONJ (14, 44, 45, 68, 75). Sabe-se que os parâmetros utilizados para a laserfototerapia influenciam nos resultados obtidos (76). No presente estudo, os parâmetros utilizados foram determinados por estudos prévios onde observaram que menor densidade de energia foi mais eficaz para estimular células em cultura (76-78).

As células utilizadas para realização desse trabalho foram fibroblastos e osteoblastos, células presentes no processo de reparação tecidual afetadas pela MRONJ. Sendo esses os tipos

celulares que mais irão participar no processo de reparação nas regiões acometidas pela MRONJ.

Os resultados do presente estudo demonstraram que o ácido zoledrônico mesmo na maior concentração utilizada (10 μ M) apresenta maior toxicidade em longo prazo. Assim como o alendronato sódico nas concentrações de 100 μ M e 10 μ M também apresentaram maior toxicidade em longo prazo. Acreditamos que esse resultado possa estar relacionado ao fato de que a MRONJ demora a se manifestar clinicamente. Que para o paciente entrar em estágio de risco para desenvolvimento da lesão são necessárias pelo menos 6 doses da medicação por via endovenosa (ácido zoledrônico) e 156 doses do utilizado por via oral (alendronato sódico) na maioria dos casos. (9)

Para o alendronato sódico observamos que a concentração de 1 μ M não foi citotóxica para as células utilizadas, e com isso o laser não alterou a viabilidade celular, visto que as células não tiveram alteração metabólica nem por déficit nutricional nem pela citotoxicidade da droga a qual foram expostas. Almeida Lopes et al em 2001 realizaram trabalho com laserfototerapia em células em cultivo e observaram que o déficit nutricional foi fundamental para que as células respondessem a fototerapia (79).

Os nossos resultados demonstraram que as concentrações utilizadas não apresentaram toxicidade suficiente para causar estresse metabólico celular, o laser não tinha como atuar para melhorar os resultados.

Na metodologia utilizada tentamos mimetizar o que ocorre na clínica. Mantivemos as células nas condições ideais de cultivo, mantendo o suprimento com soro fetal bovino. Basso et al (19) e Pansani et al (20) que aplicaram a droga em meio sem soro, potencializando as condições adversas do cultivo celular. Acreditamos que as condições ideais de cultivo favoreçam o metabolismo celular contribuindo para que as células não perdessem a viabilidade mesmo

quando expostas a droga na concentração de 5 μ M, mesma concentração utilizada pelos autores citados.

Observamos também que o laser vermelho nos parâmetros utilizados não foi capaz de alterar o número de células viáveis ao final do experimento (72h), ocorrendo inclusive uma diminuição da viabilidade celular ao ser comparada ao controle positivo.

Com os resultados apresentados acreditamos que o ácido zoledrônico possa atuar na capacidade metabólica da célula. Acreditamos também que sua atuação com as concentrações que utilizamos seja maior nos osteoclastos.

A concentração de 5 μ M que o trabalho de Scheper et al (66) refere ser a maior concentração do ácido zoledrônico encontrada na cavidade oral foi citotóxica para as células testadas no presente estudo; e promoveu alteração metabólica da fosfatase alcalina.

Observamos que o controle negativo apresentou morte celular significativa para os dois tipos testados, tanto para o alendronato sódico nas concentrações de 100 μ M e 10 μ M quanto para o ácido zoledrônico nas concentrações de 3 μ M, 5 μ M e 10 μ M. E apesar do laser em especial o parâmetro de 5J esboçar uma reação de crescimento celular em relação ao controle negativo não irradiado, o número de células viáveis não foi diferente estatisticamente desses.

O ácido zoledrônico, independentemente da concentração aplicada, levou à diminuição significativa na atividade de fosfatase alcalina e a LPT não foi capaz de compensar essa inibição. O alendronato sódico também provocou diminuição da atividade de ALP, exceto quando aplicado na concentração de 10 μ m em culturas irradiadas ou não com 5J/cm². LPT usando 10J/cm² inibiu a atividade desta enzima, para ambos os BPs analisados. Nos parâmetros aqui aplicado a LPT não tem efeito sobre a atividade da fosfatase alcalina das células tratadas com o alendronato de sódio ou ácido zoledrônico.

Os estudos in vitro (53, 80-82) tem apresentado contribuição importante para a elucidação da etiopatogenia da MRONJ, visto que esse tipo de estudo consegue isolar fatores e com isso corroborar para o entendimento dos fenômenos observados clinicamente nos pacientes acometidos com MRONJ.

O nosso estudo foi delineado visando compreender de que maneira os benefícios observados clinicamente com o uso da fototerapia com laser de baixa intensidade acontece com dois diferentes tipos celulares envolvidos com a MRONJ. Clinicamente estudos relatam, e observamos que a laserfototerapia contribui de maneira significativa para a melhora clínica do quadro de MRONJ, principalmente contribuindo para o recobrimento do osso necrótico exposto (13, 14, 16). Observamos que nos parâmetros e concentrações que utilizamos o laser não foi capaz de reverter a citotoxicidade dos bisfosfonatos testados. Acreditamos que parâmetros diferentes e outros fatores como a estimulação da angiogênese provocados pelo laser sejam responsáveis pela melhora clínica da lesão.

7 CONCLUSÕES

Frente aos resultados obtidos podemos concluir:

- A laserfototerapia de baixa potência nos parâmetros utilizados nesse estudo não foi capaz de reverter a toxicidade dos bisfosfonatos testados, independentemente das concentrações destas substâncias.
- Nos parâmetros aqui aplicados a LPT não teve efeito sobre a atividade da fosfatase alcalina das células tratadas com o alendronato de sódio ou ácido zoledrônico

REFERÊNCIAS¹

1. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw-2014 Update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014;72(10):1938-56. Epub 2014/09/23.
2. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev.* 1998;19(1):80-100. Epub 1998/03/12.
3. ADA. Dental management of patients receiving oral bisphosphonate therapy: expert panel recommendations. *J Am Dent Assoc.* 2006;137(8):1144-50. Epub 2006/07/29.
4. Compston J, Bowring C, Cooper A, Cooper C, Davies C, Francis R, et al. Diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women and older men in the UK: National Osteoporosis Guideline Group (NOGG) update 2013. *Maturitas.* 2013;75(4):392-6. Epub 2013/07/03.
5. Ruggiero SL. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Compend Contin Educ Dent.* 2008;29(2):96-8, 100-2, 4-5. Epub 2008/04/24.
6. 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. Epub 2006/09/26.
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;62(5):527-34. Epub 2004/05/04.
8. Heras Rincon I, Zubillaga Rodriguez I, Castrillo Tambay M, Montalvo Moreno JJ. Osteonecrosis of the jaws and bisphosphonates. Report of fifteen cases. Therapeutic recommendations. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal.* 2007;12(4):E267-71. Epub 2007/08/01.
9. Marx RE. Oral and Intravenous Bisphosphonate–Induced Osteonecrosis of the Jaws History, Etiology, Prevention, and Treatment - Second Edition: Quintessence Publishing Co, Inc; 2011. 162 p.

¹ De acordo com o estilo Vancouver

10. Brozoski MA, Lemos CA, Da Graca Naclerio-Homem M, Deboni MC. Adjuvant aqueous ozone in the treatment of bisphosphonate induced necrosis of the jaws: report of two cases and long-term follow-up. *Minerva stomatologica*. 2014;63(1-2):35-41. Epub 2014/02/04.
11. Ripamonti CI, Cislighi E, Mariani L, Maniezzo M. Efficacy and safety of medical ozone (O₃) 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;47(3):185-90. Epub 2011/02/12.
12. Agrillo A, Filiaci F, Ramieri V, Riccardi E, Quarato D, Rinna C, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): 5 year experience in the treatment of 131 cases with ozone therapy. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2012;16(12):1741-7. Epub 2012/11/20.
13. Martins MA, Martins MD, Lascala CA, Curi MM, Migliorati CA, Tennis CA, et al. Association of laser phototherapy with PRP improves healing of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in cancer patients: a preliminary study. *Oral Oncol*. 2012;48(1):79-84. Epub 2011/09/24.
14. 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;29(7):447-52. Epub 2011/01/18.
15. Vescovi P, Manfredi M, Merigo E, Guidotti R, Meleti M, Pedrazzi G, et al. Early surgical laser-assisted management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ): a retrospective analysis of 101 treated sites with long-term follow-up. *Photomed Laser Surg*. 2012;30(1):5-13. Epub 2011/11/08.
16. 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;26(1):37-46. Epub 2008/02/06.
17. 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. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 2007;45(8):628-32. Epub 2007/05/26.
18. Vescovi P, Meleti M, Merigo E, Manfredi M, Fornaini C, Guidotti R, et al. Case series of 589 tooth extractions in patients under bisphosphonates therapy. Proposal of a clinical protocol supported by Nd:YAG low-level laser therapy. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. 2013;18(4):e680-5. Epub 2013/03/26.

19. Basso FG, Turrioni AP, Soares DG, Bagnato VS, Hebling J, de Souza Costa CA. Low-level laser therapy for osteonecrotic lesions: effects on osteoblasts treated with zoledronic acid. *Support Care Cancer*. 2014;22(10):2741-8. Epub 2014/05/08.
20. Pansani TN, Basso FG, Turirioni AP, Kurachi C, Hebling J, de Souza Costa CA. Effects of low-level laser therapy on the proliferation and apoptosis of gingival fibroblasts treated with zoledronic acid. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014;43(8):1030-4. Epub 2014/03/25.
21. 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;104(1):83-93. Epub 2005/06/02.
22. 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*. 2008;36(2):95-103.
23. Sawatari Y, Marx RE. Bisphosphonates and bisphosphonate induced osteonecrosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2007;19(4):487-98, v-vi.
24. Marx RE, Cillo JE, Jr., Ulloa JJ. Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007;65(12):2397-410.
25. King AE, Umland EM. Osteonecrosis of the jaw in patients receiving intravenous or oral bisphosphonates. *Pharmacotherapy*. 2008;28(5):667-77. Epub 2008/05/02.
26. 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;66(2):223-30.
27. 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.
28. 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*. 1996;335(14):1016-21. Epub 1996/10/03.
29. Marx R. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2003;61(9):1115-7.

30. Marx R. Uncovering the Cause of “Phossy Jaw” Circa 1858 to 1906: Oral and Maxillofacial Surgery Closed Case Files—Case Closed. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2008;66(11):2356-63.
31. Hohneker JA, Bess AL. Important drug precaution for dental health professionals with patients being treated for cancer. *Tex Dent J*. 2005;122(9):973-4.
32. Allen MR, Burr DB. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67(5 Suppl):61-70. Epub 2009/04/25.
33. Reid IR, Bolland MJ, Grey AB. Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? *Bone*. 2007;41(3):318-20.
34. 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;66(4):767-75.
35. 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*. 2007;29(8):1548-58.
36. Woo SB, Hande K, Richardson PG. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates. *N Engl J Med*. 2005;353(1):99-102; discussion 99-.
37. Mariotti A. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *J Dent Educ*. 2008;72(8):919-29.
38. 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.
39. Ruggiero SL, Woo SB. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Dent Clin North Am*. 2008;52(1):111-28, ix.
40. 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. Epub 2007/05/15.
41. Edwards BJ, Hellstein JW, Jacobsen PL, Kaltman S, Mariotti A, Migliorati CA. Updated recommendations for managing the care of patients receiving oral bisphosphonate therapy: an advisory statement from the American Dental Association Council on Scientific Affairs. *J Am Dent Assoc*. 2008;139(12):1674-7. Epub 2008/12/03.

42. 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;X(X):6. Epub 2011/01/18.
43. Coelho AI, Gomes PS, Fernandes MH. Osteonecrose dos Maxilares Associada ao Uso de Bifosfonatos. Parte II: Linhas de Orientação na Consulta de Medicina Dentária. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac.* 2010;51:185-91.
44. Martins MAT, Martins MD, Lascala CA, Curi MM, Migliorati CA, Marques MM. Association of laser phototherapy with PRP improves healing of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in cancer patients: a preliminary study. *Oral Oncology* 2011;in press.
45. Scoletta M, Arduino PG, Reggio L, Dalmaso P, Mozzati M. Effect of low-level laser irradiation on bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: preliminary results of a prospective study. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(2):179-84. Epub 2009/10/03.
46. Azevedo LH, de Paula Eduardo F, Moreira MS, de Paula Eduardo C, Marques MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth : a pilot study. *Lasers Med Sci.* 2006;21(2):86-9. Epub 2006/05/16.
47. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers in surgery and medicine.* 2001;29(2):179-84. Epub 2001/09/13.
48. Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers in surgery and medicine.* 2004;34(3):260-5. Epub 2004/03/17.
49. Fujihara NA, Hiraki KR, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers in surgery and medicine.* 2006;38(4):332-6. Epub 2006/03/10.
50. Eduardo FP, Mehnert DU, Monezi TA, Zezell DM, Schubert MM, Eduardo CP, et al. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. *Lasers in surgery and medicine.* 2007;39(4):365-72. Epub 2007/04/26.
51. Chen CH, Hung HS, Hsu SH. Low-energy laser irradiation increases endothelial cell proliferation, migration, and eNOS gene expression possibly via PI3K signal pathway. *Lasers in surgery and medicine.* 2008;40(1):46-54. Epub 2008/01/29.

52. Brozoski MA, Naclério-Homem MG. Efeito de diferentes concentrações do alendronato sódico sobre a viabilidade e proliferação de diferentes tipos celulares em cultura [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2011.
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.* 2005;21(6):329-35. Epub 2005/11/03.
54. Correia VFP, Caldeira CL, Marques MM. Cytotoxicity evaluation of sodium alendronate on cultured human periodontal ligament fibroblasts. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology.* 2006;22(6):312-7. Epub 2006/11/01.
55. Basso FG, Pansani TN, de Oliveira CF, Turrioni AP, Soares DG, Hebling J, et al. Cytotoxic effects of zoledronic acid on human epithelial cells and gingival fibroblasts. *Braz Dent J.* 2013;24(6):551-8. Epub 2014/01/30.
56. Deboni MCZ, Marques MM, Araújo NS. Obtencao e caracterizacao de linhagem de celulas osteoblasticas. *Revista da Pos-Graduacao da Faculdade de Odontologia da Universidade de Sao Paulo.* 1996;3(3):220-9.
57. 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. Epub 2000/05/12.
58. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications.* 6th ed: Wiley-Blackwell; 2010.
59. Zatz MM. *Culture of Animal-Cells - a Manual of Basic Technique - Freshney, Ri.* *Am Sci.* 1984;72(2):204-.
60. Marx RE. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: a challenge, a responsibility, and an opportunity. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2008;28(1):5-6.
61. Marx RE, Cillo JE, Jr., Ulloa JJ. Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65(12):2397-410. Epub 2007/11/21.
62. 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;67(5 Suppl):2-12. Epub 2009/04/25.

63. Sawatari Y, Marx RE. Bisphosphonates and bisphosphonate induced osteonecrosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2007;19(4):487-98, v-vi. Epub 2007/12/20.

64. Scheper M, Chaisuparat R, Cullen K, Meiller T. A novel soft-tissue in vitro model for bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2010;3:6.

65. Agis H, Blei J, Watzek G, Gruber R. Is zoledronate toxic to human periodontal fibroblasts? *J Dent Res.* 2010;89(1):40-5.

66. Scheper MA, Badros A, Salama AR, Warburton G, Cullen KJ, Weikel DS, et al. A novel bioassay model to determine clinically significant bisphosphonate levels. *Support Care Cancer.* 2009;17(12):1553-7. Epub 2009/08/05.

67. Price N, Lipton A, Jain VK, Ruggiero S. Prevention and management of osteonecrosis of the jaw associated with bisphosphonate therapy. *Support Cancer Ther.* 2004;2(1):14-7. Epub 2008/07/17.

68. 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. Epub 2014/09/23.

69. Vescovi P, Merigo E, Manfredi M, Meleti M, Fornaini C, Bonanini M, et al. [Surgical treatment of maxillary osteonecrosis due to bisphosphonates using an Er:YAG (2940 nm) laser. Discussion of 17 clinical cases]. *Rev Belge Med Dent (1984).* 2009;64(2):87-95.

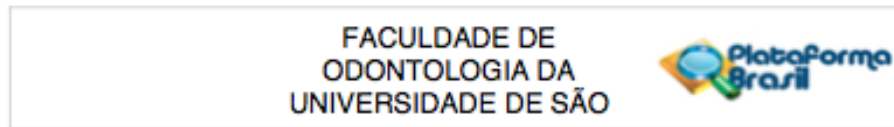
70. Vescovi P, Manfredi M, Merigo E, Meleti M, Fornaini C, Rocca JP, et al. Surgical approach with Er:YAG laser on osteonecrosis of the jaws (ONJ) in patients under bisphosphonate therapy (BPT). *Lasers in medical science.* 2010;25(1):101-13. Epub 2009/06/23.

71. Rugani P, Acham S, Truschnegg A, Obermayer-Pietsch B, Jakse N. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws: surgical treatment with ErCrYSGG-laser. Case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;110(6):e1-6. Epub 2010/11/30.

72. Vescovi P, Merigo E, Meleti M, Manfredi M, Fornaini C, Nammour S, et al. Conservative surgical management of stage I bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *International journal of dentistry.* 2014;2014:107690. Epub 2014/03/22.

73. Karu TI. Effects of visible radiation on cultured cells. *Photochemistry and photobiology*. 1990;52(6):1089-98. Epub 1990/12/01.
74. Kaighn ME. Culture of Animal-Cells - a Manual of Basic Technique - Freshney, Ri. *Q Rev Biol*. 1984;59(3):317-.
75. 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. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 2007;45(8):628-32. Epub 2007/05/26.
76. Azevedo LH, de Paula Eduardo F, Moreira MS, de Paula Eduardo C, Marques MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth : a pilot study. *Lasers in medical science*. 2006;21(2):86-9. Epub 2006/05/16.
77. Eduardo FP, Mehnert DU, Monezi TA, Zezell DM, Schubert MM, Eduardo CP, et al. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. *Lasers in surgery and medicine*. 2007;39(4):365-72. Epub 2007/04/26.
78. Eduardo Fde P, Bueno DF, de Freitas PM, Marques MM, Passos-Bueno MR, Eduardo Cde P, et al. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. *Lasers in surgery and medicine*. 2008;40(6):433-8. Epub 2008/07/24.
79. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers in surgery and medicine*. 2001;29(2):179-84. Epub 2001/09/13.
80. Basso FG, Silveira Turrioni AP, Hebling J, de Souza Costa CA. Zoledronic acid inhibits human osteoblast activities. *Gerontology*. 2013;59(6):534-41. Epub 2013/07/23.
81. Panzavolta S, Torricelli P, Bracci B, Fini M, Bigi A. Alendronate and Pamidronate calcium phosphate bone cements: setting properties and in vitro response of osteoblast and osteoclast cells. *J Inorg Biochem*. 2009;103(1):101-6. Epub 2008/11/04.
82. 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. *British journal of haematology*. 2009;144(5):667-76. Epub 2008/11/28.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da laserterapia sobre a viabilidade e proliferação de diferentes tipos celulares em cultura submetidos a diferentes concentrações do alendronato sódico e ácido zoledrônico.

Pesquisador: Maria da Graça Naclério-Homem

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 11884713.0.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo ((FAPESP))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 280.024

Data da Relatoria: 22/05/2013

Apresentação do Projeto:

Será realizada avaliação in vitro do efeito de diferentes concentrações dos bisfosfonatos mais empregados na atualidade (alendronato e ácido zoledrônico) na viabilidade e proliferação de células envolvidas na cicatrização de lesões BRONJ (bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws) como osteoblastos, fibroblastos; secundariamente estudar o efeito da fototerapia com laser de baixa potência sobre estas células previamente induzidas pelos BFs. Utilizando os ensaios de atividade mitocondrial (MTT), e no caso dos osteoblastos atividade da fosfatase alcalina. Serão utilizados osteoblastos-símile da linhagem OSTEO 1 e fibroblastos de mucosa bucal humana da linhagem FMM1. Os dados serão comparados estatisticamente.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar comparativamente o efeito da laserterapia sobre a viabilidade e proliferação de osteoblastos e fibroblastos em cultura, submetidos a diferentes concentrações de alendronato sódico e ácido zoledrônico utilizando a análise de viabilidade celular medida pela atividade mitocondrial.

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

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer- 280.024

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores relatam que não há riscos para o sujeito uma vez que trabalharão com células pertencentes ao banco de células do Laboratório de Pesquisa Básica do Departamento de Dentística da FOU SP, não envolvendo a participação direta de pacientes nesse momento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A Pesquisa está bem descrita e a pesquisadora realizou a alteração no cronograma como previamente solicitado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos obrigatórios foram apresentados.

Recomendações:

Aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 22 de Maio de 2013

Assinador por:
Maria Gabriela Hays Biazevic
(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