



CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS

VANESSA DE VASCONCELOS

Efeito da matriz de colágeno Mucograft® em defeito semi-crítico mandibular de ratos
submetidos a modelo experimental de Osteonecrose Maxilar induzida pelo uso de
Bisfosfonatos

FORTALEZA
2019

EFEITO DA MATRIZ DE COLÁGENO MUCOGRAFT® EM DEFEITO SEMI-
CRÍTICO MANDIBULAR DE RATOS SUBMETIDOS A MODELO
EXPERIMENTAL DE OSTEONECROSE MAXILAR INDUZIDA POR
BISFOSFONATOS.

VANESSA DE VASCONCELOS

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Odontológicas do Centro Universitário
Christus como requisito parcial para obtenção
do título de mestre em Ciências
Odontológicas.

Autora: Vanessa de Vasconcelos

Orientador: Prof Dr. Rafael Linard Avelar

Co-orientador: Prof Dr. Paulo Goberlânio de
Barros Silva

FORTALEZA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Centro Universitário Christus - Unichristus
Gerada automaticamente pelo Sistema de Elaboração de Ficha Catalográfica do
Centro Universitário Christus - Unichristus, com dados fornecidos pelo(a) autor(a)

V331e Vasconcelos, Vanessa de.
Efeito da matriz de colágeno Mucograft® em defeito semi-crítico
mandibular de ratos submetidos a modelo experimental de
Osteonecrose Maxilar induzida pelo uso de Bisfosfonatos / Vanessa
de Vasconcelos. - 2019.
42 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) - Centro Universitário Christus -
Unichristus, Mestrado em Ciências Odontológicas, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Rafael Linard Avelar.
Área de concentração: Ciências Odontológicas.

1. Bisfosfonatos. 2. Ácido Zoledrônico. 3. Alendronato. 4.
Osteonecrose. 5. Osteonecrose induzida pelo uso de Bisfosfonato. I.
Título.

CDD 617.6

VANESSA DE VASCONCELOS

EFEITO DA MATRIZ DE COLÁGENO MUCOGRAFT® EM DEFEITO SEMI-
CRÍTICO MANDIBULAR DE RATOS SUBMETIDOS A MODELO
EXPERIMENTAL DE OSTEONECROSE MAXILAR INDUZIDA POR
BISFOSFONATOS

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Odontológicas, do Centro Universitário Christus, como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Linard Avelar (Orientador)

Centro Universitário Christus

Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva

Centro Universitário Christus

Profa. Dr. Fábio Wildson Gurgel Costa

Universidade Federal do Ceará – UFC

Dedico este trabalho ao meu marido Herbet Cunha que não mediu esforços em me ajudar e permaneceu me dando força e suporte em cada etapa deste Curso de Mestrado.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus pela oportunidade de viver essa etapa da minha vida. Fazer Mestrado sempre foi um sonho para mim e esse sonho foi compartilhado com meu companheiro de vida Herbet Cunha, que viveu e sonhou junto comigo, não mediu esforços para que eu concluísse essa etapa. No meio do caminho, veio nosso filho Heitor que deixou essa jornada ainda mais desafiadora porém, não menos encantadora. Fui desafiada como mãe, esposa, profissional e acadêmica. Durante um puerpério difícil consegui manter o foco dos estudos, durante os primeiros meses de vida do meu filho, entre uma mamada e outra, entre sonecas e com a ajuda do meu marido, segui escrevendo essas linhas fruto de um trabalho concluso. Aos meus pais e irmãos que sempre torceram por mim. Gostaria de agradecer aos meus orientadores Rafael Linard e Paulo Goberlânio pelo trabalho que desempenharam e que levarei para a vida como exemplo de docência e profissionalismo. A todos os Professores e Coordenadores do Curso de Pós-Graduação em Ciencias Odontológicas da Unichristus, meu muito obrigada! A primeira turma do Curso de Mestrado da Unichristus, obrigada pela parceria, pela harmonia e pela torcida mútua. Hoje me sinto mais realizada e mais forte!

“A maior recompensa para o trabalho do homem, não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso.” (John Ruskin)

RESUMO

Introdução: Os Bisfosfonatos são drogas de primeira escolha para tratar doenças que acometem o metabolismo ósseo, podendo serem administrados por via oral como o Alendronato (ALD), fármaco de escolha no tratamento da osteoporose avançada, bem como por via endovenosa, como o Ácido Zoledrônico (AZ), para tratamento e prevenção de metástases ósseas. Diversos modelos experimentais em ratos têm sido desenvolvidos tendo como fator desencadeador a exodontia, o que dificulta o estudo da aplicação de matrizes teciduais no seu tratamento, devido ao tamanho reduzido do alvéolo dentário desses animais. Não se conhece o comportamento da Osteonecrose dos Maxilares induzida pelo uso de Bisfosfonatos (OMB) frente à procedimentos cirúrgicos maiores, nem como matrizes teciduais são capazes de controlar essa condição no complexo maxilo-facial e nem como matrizes de colágeno podem interferir na sua patogênese. **Objetivo:** Avaliar o efeito de uma matriz de colágeno (Mucograft®) na patogênese da OMB em defeito crítico no ramo mandibular de ratos. **Materiais e métodos:** Para isso, foram utilizados 18 ratos machos da linhagem Wistar tratados com gavagem e administração via endovenosa (e.v.), veia dorsal peniana com volume de 0,1ml/kg divididos em 3 grupos mediante fármacos: um grupo controle (GC) tratado com solução salina por gavagem e e.v, um grupo tratado com gavagem de Alendronato 5mg/kg (GA) e administração e.v. de solução Salina e um grupo tratado com Ácido Zoledrônico 0,2mg/kg (AZ) e.v. e gavagem de solução salina (GZ). As gavagens foram realizadas semanalmente e as administrações venosas seguiram protocolo previamente descrito na literatura: AZ nos dias 0, 7 e 14, solução salina nos dias 21, 28, 35 e 42, AZ no dia 49 e solução salina nos dias 56 e 63. O procedimento cirúrgico ocorreu no dia 42, no qual, após anestesia com xilazina (20mg/kg) e quentamina (80mg/kg), foi feita tricotomia do ramo da mandíbula dos animais bilateralmente, afastamento do masseter e confecção de defeito semicrítico circular utilizando Broca Lança Neodent® 2 mm de diâmetro com 1100 rpm. Os defeitos do lado direito foram preenchidos por coágulo autógeno e fragmento de mesmo diâmetro da matriz de colágeno Mucograft® (lado Mucograft®) e os defeitos do lado esquerdo foram preenchidos apenas por coágulo autógeno (lado controle). Após sutura, os animais seguiram no protocolo experimental e foram eutanasiados após 70 dias do início do experimento (28 dias após procedimento cirúrgico). As hemimandíbulas foram removidas cirurgicamente, acondicionadas em

formol neutro 10%, radiografadas utilizando um aparelho de RX (DabiAtlante® Spectro 70X Seletronic) acoplado a um sistema de captura de imagem (Digora Instrumentarium Express) e posteriormente foram submetidos a descalcificação com EDTA 10% pH 7,4 por 60 dias com trocas a cada 10 dias. Após a descalcificação, foram confeccionadas lâminas coradas por hematoxilina eosina para descrição histológica. **Resultados:** Pode-se observar área no GC área radiolúcida difusa com bordos bem definidos no lado controle e total reparo tecidual no lado Mucograft®. No GA, em ambos os lados pôde-se observar lesão radiolúcida de bordos irregulares no ramo da mandíbula, apresentando menor dimensão no lado Mucograft®. No GZ em ambos os lados pôde-se observar lesão radiolúcida de bordos irregulares, no entanto, discreta área de neoformação óssea nas bordas da lesão. Histologicamente, os resultados foram similares, com total neoformação óssea no GC tratado com Mucograft® em comparação ao lado controle que apresentava discreto infiltrado inflamatório e defeito ainda aberto. No GA e no GZ intenso infiltrado inflamatório foi observado nos lados controle associado a retardo de reparo ósseo e tecido ósseo desvitalizado, respectivamente. No lado Mucrograf® discreto infiltrado inflamatório associado igualmente a retardo de reparo ósseo e tecido ósseo desvitalizado, respectivamente pôde ser observado. Conclusão: O uso da matriz de colágeno Mucograft® acelerou o reparo ósseo no GC e reduziu sinais imaginológicos de OMB nos grupos GA e GZ, sem interferir no retardo do reparo ósseo e na OMB, respectivamente.

Descritores (DeCS): Bisfosfonatos, Ácido Zoledrônico, Alendronato, Osteonecrose, Osteonecrose induzida pelo uso de Bisfosfonato, Matriz de colágeno, Mucograft®

ABSTRACT

Introduction: Bisphosphonates are drugs of first choice to treat diseases that affect bone metabolism and can be administered orally as the Alendronate (ALD) drug of choice in the treatment of advanced osteoporosis as well as by intravenous route such as Zoledronic Acid) for treatment and prevention of bone metastases. Due to the ability to inhibit the function of osteoclasts, they have been associated with osteonecrosis of the jaw associated with the use of Bisphosphonates, a subclass of a greater condition known as Osteonecrosis of the Jaw associated with the use of Bisphosphonates (BRONJ). Several experimental models in rats have been developed with the triggering factor of the extraction, which makes it difficult to study the application of tissue matrix in its treatment, due to the reduced size of the dental alveolus of these animals. We do not know the behavior of BRONJ in the face of major surgical procedures, neither as tissue matrices are able to control this condition in the maxillofacial complex nor even as collagen matrices can interfere in its pathogenesis. **Objective:** The objective of this study is to evaluate the effect of a collagen matrix (Mucograft®) on the pathogenesis of BRONJ in a critical defect in the mandibular ramus of rats. **Materials and Methods:** 18 male Wistar rats treated with gavage and venous administration (dorsal penile vein) with a volume of 0.1 ml / kg were divided into 3 groups by drugs: a control group (GC) treated with saline solution by gavage and ev, a group treated with gavage of alendronate 5mg / kg (GA) and administration ev of saline solution 0.1mg / kg and a group treated with AZ 0.2mg / kg (AZ) e.v. and gavage of saline solution (GZ). The gavages were performed weekly and the venous administrations followed protocol previously described in the literature: AZ on days 0, 7 and 14, saline solution on days 21, 28, 35 and 42, AZ on day 49 and saline on days 56 and 63. The surgical procedure occurred on day 42, in which, after anesthesia with xylazine (20mg / kg) and quentamine (80mg / kg), the mandible branch was tricotomized bilaterally, leaving the masseter and making a circular semi-circular defect of 2 mm diameter using Neodent® Boom Drill 2 mm in diameter at 1100 rpm. The defects on the right side were filled by autogenous clot and fragment of the same diameter of the Mucograft® collagen matrix, and the defects on the left side were filled only by autogenous clot. After suturing, the animals were followed in the experimental protocol and euthanized after 70 days from the start of the experiment (28 days after surgical procedure). The hemimandibles were surgically removed, conditioned in 10% neutral formalin, radiographed using an RX

apparatus (DabiAtlante® Spectro 70X Seletronic) coupled to an image (Digora Instrumentarium Express) and were subsequently submitted to decalcification with 10% EDTA pH 7.4 for 60 days with changes every 10 days. After decalcification, blades stained with hematoxylin eosin were prepared for histological description. **Results:** It is possible to observe area in the CG diffuse radiolucent area with well-defined borders on the control side and total tissue repair on the Mucograft® side. In GA, on both sides it was possible to observe radiolucent lesion of irregular borders in the branch of the mandible, presenting smaller dimension in the Mucograft side. In the GZ on both sides it was possible to observe radiolucent lesion of irregular borders, however, a discrete area of bone neoformation at the edges of the lesion. Histologically, the results were similar, with total bone neoformation in the GC treated with Mucograft® compared to the control side that presented discrete inflammatory infiltrate and still open defect. In GA and in the intense GZ inflammatory infiltrate was observed on the control sides associated with delayed bone repair and devitalized bone tissue, respectively. On the side Mucrograf® discrete inflammatory infiltrate associated with a delayed repair of bone and devitalized bone tissue, respectively, could be observed. **Conclusion:** The use of the Mucograft® collagen matrix accelerated bone repair in the GC and reduced imaging signs of BRONJ in the GA and GZ groups, without interfering in the bone repair delay and the BRONJ, respectively.

Keywords: Bisphosphonates, Zoledronic Acid, Alendronate, Osteonecrosis, Osteonecrosis induced by the use of Bisphosphonate, Collagen Matrix, Mucograft®

LISTA DE ABREVIATURAS

ALN	Alendronato
AZ	Ácido Zoledrônico
BP	Bifosfonatos
BRONJ	Biphosphonate Related Osteonecroses of the Jaws
GA	Grupo Alendronato
GC	Grupo Controle
GZ	Grupo Zoledronato
MRONJ	Medication Related Osteonecrosis of the Jaws
OMB	Osteonecrose dos Maxilares associado ao uso de
Bisfosfonatos	
OMM	Osteonecrose dos Maxilares associado ao uso de
Medicamentos	
ROG	Regeneração Óssea Guiada
RTG	Regeneração Tecidual Guiada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Osteonecrose dos Maxilares associado ao uso de Bisfosfonatos (OMB).....	11
1.2. Membranas de matriz de colágeno: Mucograft®	13
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. MATERIAIS	E
MÉTODOS.....	17
3.1. Animais	17
3.2. Cálculo amostral	17
3.3. Desenho experimental	17
3.4. Procedimento cirúrgico	18
3.5. Análise Radiográfica digital	20
3.6. Confeção de lâminas histológicas e análise histopatológica	20
3.7. Análise estatística	20
4. RESULTADOS.....	21
4.1. Tratamento com ALD ou AZ não modifica perfil de ganho de massa corpórea em ratos submetidos a modelo de defeito semi-crítico em mandíbula de ratos	21
4.2. Tratamento com Mucograft® acelera cicatrização tecidual, porém, não reduz aspectos imaginológicos de OMB.....	21

4.3. Tratamento com Mucograft® estimula neoformação óssea, reduz infiltrado inflamatório local, porém, não reduz aspectos imaginológicos de OMB	22
5.	DISCUSSÃO 26
6. CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
ANEXO 1: Parecer do Comitê de Ética	36

1. INTRODUÇÃO

1.1. Osteonecrose dos Maxilares associado ao uso de Bisfosfonatos (OMB)

A Osteonecrose dos Maxilares é uma osteomielite crônica multifatorial ligada a fatores locais e sistêmicos. Os fatores locais permissivos são: tratamentos cirúrgicos orais, doenças periodontais e pressão excessiva da prótese removível na mucosa muito fina. Os fatores sistêmicos relevantes capazes de influenciar o desenvolvimento da osteonecrose da mandíbula englobam imunossupressão, quimioterapia, terapia com corticosteróides e doenças endócrinas. (BORGIOLO et al., 2009)

Osteonecrose farmacológica do maxilar em pacientes oncológicos tratados com Bisfosfonatos intravenosos era uma entidade clínica desconhecida até 2003, quando Marx descreveu 36 casos em pacientes afetados por tumores malignos. Desde então, vários autores relataram casos, e muitos profissionais de odontologia, particularmente cirurgias bucomaxilofaciais, identificaram numerosos casos não publicados. A essa época, tal condição foi denominada Biphosphonate Related Osteonecroses of the Jaws BRONJ. (MARX et al., 2005).

Desde o estudo de Marx, outros estudos sobre BRONJ foram publicados. Em 2004, Ruggiero e colaboradores publicaram 63 casos de BRONJ, sendo a maioria dos casos dependente do uso de administração intravenosa de Bisfosfonato em pacientes com câncer e apenas poucos pacientes tratados com Bisfosfonatos orais para osteoporose. Em 2005, Marx publicou 119 casos de BRONJ e correlacionou com o tipo de droga utilizada, invasividade dos tratamentos orais, dose e duração de um determinado medicamento. No mesmo ano, Sociedades Científicas publicaram o primeiro documento de posicionamento sobre o tema. Academia de Medicina Oral descreveu manifestações clínicas destas lesões, sugeriu possíveis formas clínicas para prevenir e tratar os pacientes afetados. (BORGIOLO et al., 2009)

A Associação Americana de Cirurgias Orais e Maxilofaciais recomenda em 2014, a substituição do termo Osteonecrose dos Maxilares induzida pelo uso de Bisfosfonatos (OMB) por Osteonecrose Medicamentosa dos Maxilares, em inglês Medication Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ). A mudança é justificada para acomodar o crescente número de casos de osteonecrose envolvendo a maxila e a

mandíbula associadas a outras antirreabsortivas (denosumabe) e terapias antiangiogênicas. (RUGGUIERO et al., 2014).

A Osteonecrose Medicamentosa dos Maxilares é uma condição incomum que pode ocorrer após exposição a agentes usados para prevenir complicações ósseas, como Bisfosfonatos ou Denosumabe, ou tratamento com Antiangiogênicos. (GALITIS et al., 2018).

Os Bisfosfonatos (BPs) têm sido atualmente utilizados como terapia de primeira escolha no manejo de doenças que afetam o metabolismo ósseo (osteoporose e doença de Paget) e metástases ósseas. (GONEN; ASAN, 2016).

Hoje, os Bisfosfonatos são comumente prescritos para estabilizar a perda óssea causada pela osteoporose em milhões de mulheres pós-menopáusicas. A estratégia no tratamento da osteoporose é inibir a reabsorção de osso trabecular por osteoclastos e, portanto, preservar sua densidade. Para este propósito, os Bisfosfonatos orais são prescritos e incluem Etidronato, Risedronato, Tiludronato e Alendronato. Os Bisfosfonatos de ação mais potente são administrados por via intravenosa (IV), são Pamidronato e Zoledronato e são indicados para estabilizar o câncer metastático de mama e próstata e para tratar os defeitos de reabsorção óssea do mieloma múltiplo e hipercalcemia grave. (MARTIN, 2000).

As metástases ósseas resultam na ativação excessiva dos osteoclastos mediada por uma variedade de citocinas produzidas por células tumorais. Bisfosfonatos são análogos não metabolizados de pirofosfato que são capazes de localizar células ósseas e inibir a função osteoclástica. Os Bisfosfonatos se ligam avidamente ao osso mineralizado em torno da reabsorção dos osteoclastos, resultando em níveis muito altos desse fármaco nas lacunas de reabsorção. Por não serem metabolizados, essas altas concentrações de BPs são mantidas dentro do osso por longos períodos de tempo. Os Bisfosfonatos são então internalizados pelos osteoclastos, inibindo a função dessas células, aumentando a apoptose. Estes mecanismos afetam a reabsorção óssea inibindo o turnover ósseo. (RUGGUIERO et al., 2004)

Até o momento, sabe-se que o efeito dos Bisfosfonatos é cumulativo. Após a administração de BPs, a maior parte da droga é ligada ao plasma. Cerca de 40% da dose é excretada na urina em 24 horas e presume-se que o restante da dose esteja ligado ao osso. (COXON et al., 2000)

A Osteonecrose associada aos Bisfosfonatos da Mandíbula (OMB) se apresenta como osso necrótico exposto na região maxilofacial que não cicatriza dentro

de 8 semanas após a identificação clínica, em um paciente atualmente ou previamente tratados com BPs (FONSECA et al., 2014).

Entre os Bifosfonatos, o Alendronato (ALN) é um dos mais usados para tratamento da osteoporose. Com a administração oral, mesmo após algumas semanas de ingestão, níveis adequados de inibição da reabsorção óssea podem ser observados. Todavia, tendo em vista que nesse período há importante inibição do turnover ósseo, já é possível haver a ocorrência da Osteonecrose dos Maxilares relacionada ao uso de Bisfosfonatos. (O'RYAN; JOAN, 2012). Apesar disso, o risco de Osteonecrose nos maxilares em pacientes com osteoporose tratados com Bisfosfonatos permanece baixa, no entanto, a incidência relativa em pacientes oncológicos é maior do que se pensava anteriormente (ZUSHI et al., 2017).

Como sugerido pela Sociedade Americana de Clínica Oncologia, o Zoledronato e Pamidronato mostram uma alta potência na inibição da reabsorção óssea e são as terapias escolhidas no tratamento dos distúrbios malignos do esqueleto. A potência destas moléculas juntamente com a sua administração intravenosa em alta dosagem em pacientes oncológicos representa a base para a alta incidência de BRONJ nesses sujeitos quando comparado a pacientes com osteoporose tratados para a prevenção da fragilidade de fraturas. Outro fator importante que desempenha um papel no desenvolvimento do BRONJ é a afinidade dos cristais de hidroxiapatita pelo aminobifosfonato. (BILEZIKIAN, 2006)

Outra forma grave de Osteonecrose nos Maxilares induzida pelo uso de Bifosfonatos é a complicação associada ao tratamento oncológico. Na terapia do câncer muitas vezes há uso de Bisfosfonatos com o objetivo de evitar ou tratar metástases ósseas, e nesse contexto o Ácido Zoledrônico (AZ) é a principal droga associada a esta condição (SILVA et al, 2015).

O número de casos de Osteonecrose tende a aumentar nos pacientes que recebem o BPs intra-venoso em comparação aos doentes tratados com doses mais baixas por via oral para osteoporose, e seus sintomas incluem supuração, dor, odor, fístula, parestesia. (O'RYAN, 2012). O planejamento do tratamento é agressivo, envolvendo desbridamento cirúrgico e é necessário interromper o uso dos BPs, mas isso pode comprometer o tratamento do câncer ou da osteoporose (SILVA et al, 2015).

1.2. Membranas de matriz de colágeno: Mucograft®

O procedimento de Regeneração Tecidual Guiada (RTG) foi desenvolvido para assegurar que as células potenciais regenerativas como células do ligamento periodontal (PDL), células ósseas e cementoblastos repovoem seletivamente o periodonto e a área de ferida cirúrgica, utilizando uma barreira física. (CORTELLINI et al., 1996)

O desenvolvimento da Regeneração Tecidual Guiada (RTG) deu origem a uma série de estudos para avaliar a utilização de membranas como barreira em cirurgia reconstrutiva. Vários biomateriais que funcionam como barreiras não absorvíveis ou absorvíveis têm sido desenvolvidos e modificados na tentativa de se obter completa neoformação óssea. (GARRET, S, 1996)

Entre os biomateriais usados para Regeneração Tecidual Guiada, as matrizes de colágeno têm recebido significativa atenção. (SANZ, M, 2009).

A Regeneração Tecidual Guiada (RTG), é um procedimento no qual uma barreira é utilizada para regenerar tecido periodontal perdido com osso novo, ligamento periodontal e cimento. Vários materiais, barreiras não absorvíveis e barreiras bioabsorvíveis foram desenvolvidos e modificados em um tentar alcançar a regeneração periodontal completa. Mais recentemente, a membrana de colágeno também foi aplicada a regeneração óssea de defeitos na região peri-implante chamando o procedimento de Regeneração Óssea Guiada (ROG). (BUNYARATAVEJ P; WANG HL, 2001).

As membranas de colágeno têm sido cada vez mais utilizadas por serem biocompatíveis, absorvíveis e por permitirem colonização por células osteogênicas. De fato, é bem sabido que o colágeno favorece a adesão ao substrato de vários tipos de células e estimula a proliferação celular. (KASAJ, S et al., 2009).

O colágeno é a proteína mais abundante do corpo humano, atingindo aproximadamente um terço do peso total do corpo. Consiste em uma molécula de proteína e pode ser encontrada em abundância no tecido conjuntivo. Como parte integrante da Regeneração Óssea Tecidual Guiada (RTG e ROG, respectivamente), procedimentos dentro do periodonto, cirurgia mucogengival e maxilofacial, as membranas de colágeno tornaram-se amplamente utilizadas ao longo dos últimos 30 anos. (WILLERSHAUSEN et al., 2014)

Fibras colágenas funcionam como arcabouço para adsorção de plaquetas, fibrina, diversas moléculas de adesão celular, fatores quimiotáticos, fatores de crescimento e outros componentes das matrizes extracelulares, influenciando processos

biológicos importantes como a quimiotaxia, diferenciação e proliferação celular. (BUNYARATAVEJ P; WANG HL, 2001).

A Mucograft® é uma matriz 3D de colágeno tipo I e III produzido por Geistlich Pharma AG (Wolhusen, Suíça), totalmente reabsorvida de origem suína, usada em procedimentos de enxerto de tecidos moles e promove uma regeneração tecidual óssea guiada. (RAFAELA et al., 2015). É composta por uma estrutura de bicamada de colágeno. A camada compacta, consiste em fibras colágenas compactas com propriedades celulares oclusivas, permite a aderência dos tecidos como um pré-requisito para a cicatrização de feridas. Esta camada não só protege contra a infiltração bacteriana, mas também contém propriedades elásticas adequadas para acomodar a sutura. A segunda camada consiste em uma estrutura de colágeno esponjoso, espesso e poroso, que é colocada próxima aos tecidos do hospedeiro para facilitar a organização do coágulo sanguíneo e promover a neoangiogênese e a integração tecidual. (WILLERSHAUSEN et al., 2014)

A matriz de colágeno Mucograft® promove proliferação de fibroblastos e induz a produção de matriz extracelular. (RAFAELA et al., 2015). Segundo RAMALINGAM et al, (2016), estudos histológicos demonstraram diminuição do infiltrado inflamatório e ausência de células gigantes multinucleadas.

A Mucograft® favorece a vascularização precoce, boa integração tecidual, favorecendo a cicatrização mesmo em caso de feridas abertas, além de ser de fácil manuseio, menor desconforto pós-operatório e menor tempo cirúrgico. No entanto, apresenta um alto custo, só podendo ser usada apenas em regenerações teciduais pequenas, já que a matriz se apresenta comercialmente nas proporções de 20x30mm. (HERFORD et al., 2010).

Assim, tendo em vista as propriedades pró osteogênicas da matriz de colágeno Mucograft® e sua possibilidade de uso no controle/tratamento da OMB, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da remodelação óssea da matriz de colágeno Mucograft® em modelo de Osteonecrose dos Maxilares induzida pelo uso de Alendronato e Ácido Zoledrônico em defeito semi-crítico em ramo mandibular de ratos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito de remodelação óssea da matriz de colágeno Mucograft® em modelo de osteonecrose dos maxilares induzida pelo uso de Alendronato (ALD) ou Ácido Zoledrônico (AZ) em defeito semi-crítico em ramo mandibular de ratos.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver um modelo experimental de OMB e reproduzir um defeito semi-crítico no ramo da mandíbula de ratos Wistar.
- Avaliar os parâmetros inflamatórios do efeito da matriz de colágeno Mucograft® em modelo de osteonecrose dos maxilares induzida pelo uso de ALD e AZ em defeito semi-crítico em ramo mandibular de ratos.
- Correlacionar os achados imaginológicos aos achados histológicos de ratos submetidos a defeito semi-crítico em ramo de mandíbula tratados com ALD ou AZ submetidos a tratamento com a membrana de colágeno Mucograft®.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Obedecendo a Lei n. 11.794 de 08 de Outubro de 2008, conhecida como Lei Arouca, que regula os procedimentos para uso científico de animais, o projeto foi submetido a Comissão Ética no Uso de Animais do Centro Universitário Christus, protocolado com parecer de aprovação número 040/17 (Anexo 1). Foram utilizados 18 ratos machos (ENDELE et al, 2005) da espécie Wistar (*Rattus Novergicus*) com massa corpórea entre 180 e 220 gramas mantidos no biotério de experimentação deste centro. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas de polipropileno medindo 49x34x16cm, em número de 06 animais por caixa, numerados individualmente através de marcação no rabo refeitas quando necessário e mantidos com ração comercial balanceada própria e água *ad libitum*, em ciclos de luz-escuro de 12 horas. Todos os esforços para redução do uso de animais de laboratório, bem como dor e desconforto foram tomadas durante todo o experimento.

3.2. Cálculo amostral

Baseado no estudo de KOBAYASHI et al. (2010) que observou que camundongos tratados com ácido zoledrônico apresentavam menor área de neoformação óssea ($10\pm 10\%$) que camundongos tratados não tratados ($26\pm 4\%$) estima-se uma amostra de cinco ratos por grupo de estudo afim de obter uma amostra que represente com 90% de poder e 95% de confiança a hipótese nula deste trabalho. Tendo em vista a possibilidade de perda de amostra ao longo do curso temporal deste estudo, acresceu-se 20% totalizando seis ratos por grupo de estudo.

3.3. Desenho experimental

Os animais foram aleatória e igualmente divididos em três grupos experimentais: um Grupo Controle (GC), um grupo tratado com Alendronato (GA) e um grupo tratado com Ácido Zoledrônico (AZ).

Após anestesia com xilazina (20mg/kg) e quentamina (80mg/kg) os animais do GC foram tratados semanalmente com 0,1ml/kg de solução salina por gavagem e por

via endovenosa (e.v., acesso peniano). Os animais do GA foram tratados com o 0,1ml/kg de alendronato (Alendronato de Sódio 70mg EMS®) 6mg/kg por gavagem e 0,1ml/kg de solução salina estéril e.v. (acesso peniano), semanalmente. Os animais do GZ foram submetidos a gavagem semanal de 0,1ml/kg de solução salina estéril e administração de AZ 0,2mg/kg seguindo protocolo previamente publicado (SILVA et al., 2015): AZ 0,1ml/kg nos dias 0, 7 e 14, solução salina 0,1ml/kg nos dias 21, 28, 35 e 42 (dia do procedimento cirúrgico), AZ 0,1ml/kg no dia 49 e solução salina 0,1ml/kg nos dias 54 e 63. A eutanásia ocorreu no dia 70 por sobredose de xilazina (50mg/kg) e quentamina (150mg/kg) e os animais foram semanalmente pesados para avaliação de ganho de massa corpórea (massa final : por massa inicial x 100) (%).

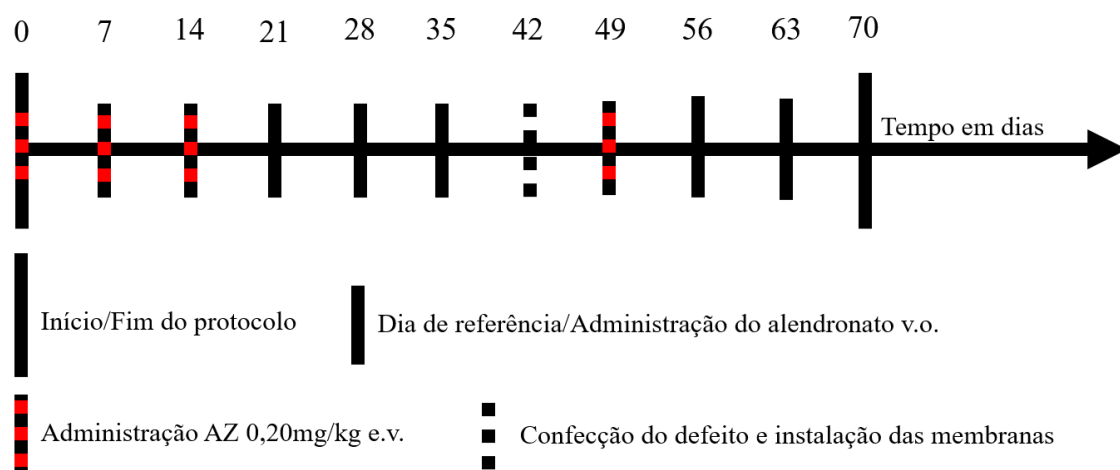


Figura 1: Desenho esquemático do protocolo experimental de indução de osteonecrose da mandíbula após defeito semicrítico (Adaptado de SILVA et al., 2015).

A dose de AZ foi obtida através da conversão da dose proposta para tratamento de metástases ósseas em seres humanos conforme descrito por SILVA et al. (2015) e a dose de Alendronato seguiu a mesma sistemática. Como a dose de Alendronato indicada para tratamento de osteoporose de uma pessoa adulta (aproximadamente 75kg é de 70mg/semana (0,95mg/kg/semana), estima-se uma dose em ratos de 6mg/kg/semana (dose humana (mg/kg)*6,2), conforme sugerido pela Food and Drug Administration (NAIR; JACOB, 2016).

3.4. Procedimento cirúrgico

O procedimento cirúrgico ocorreu 1 mês após a última dose de AZ, sob anestesia com xilazina (20mg/kg) e quentamina (80mg/kg), foi seguido o protocolo de SONIS ST et al. (2009) para a criação de defeitos calvária, adaptando ao ramo da mandíbula.

Após tricotomia do ramo da mandíbula foi realizada desinfecção da derme com três aplicações de Digliconato de Clorexina spray 1% Neba-Sept®, incisão no ângulo da mandíbula com lâmina de bisturi número 15 Solidor® em cabo de bisturi de Bad Parker Golgran® e dissecação do músculo masseter utilizando discolador de Seldin Golgran®. Após vizualização do ramo da mandíbula um defeito circular bicortical foi confeccionado utilizando uma Broca Lança Neodent® 2 mm de diâmetro acoplada em um motor Neogrug XT Plus Neodent® girando a 1100 rpm por aproximadamente 10 segundos sob irrigação com soro fisiológico. (Figura 2).

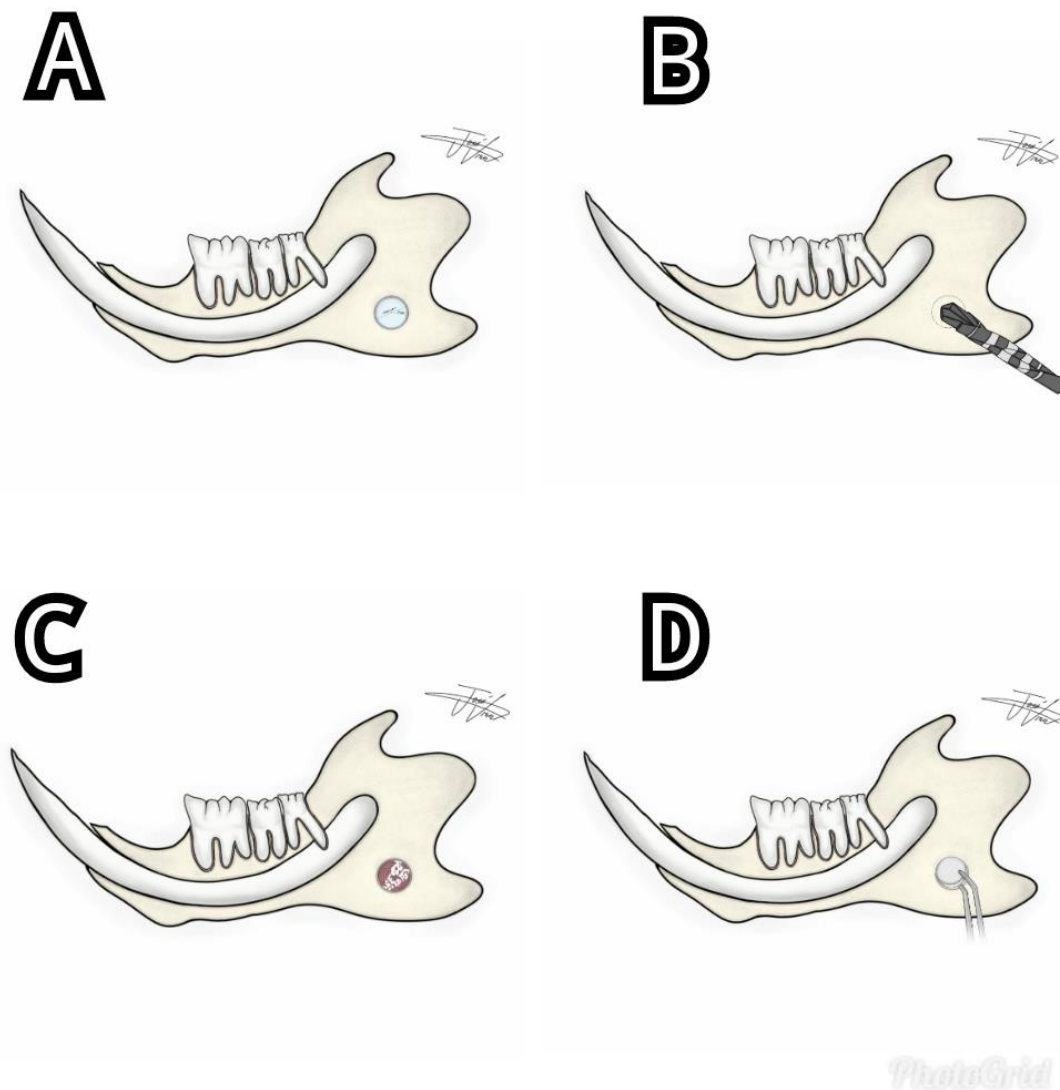


Figura 2: A- Modelo esquemático de confecção de defeito semi-crítico em ramo de mandíbula de ratos Wistar submetidos a administração de solução salina estéril, ALD

ou AZ. **B-** Desenho esquemático da broca lança no defeito ósseo. **C-** Desenho do defeito ósseo preenchido por coágulo. **D-** Desenho da Mucograft® no defeito ósseo.

O defeito foi confeccionado bilateralmente e após preenchimento com coágulo autólogo o lado esquerdo foi fechado com Fio Agulhado para Sutura Procure® Seda 4-0 SK140, utilizando a técnica de sutura ponto simples. O lado direito foi preenchido com a matriz de colágeno Mucograft® no tamanho correspondente ao defeito cirúrgico e igualmente fechado com fio de sutura (Fio Agulhado para Sutura Procure® Seda 4-0 SK140) e mesma técnica (Figura 3). Buprnfina 0,25mg/kg a cada 12 horas por gavagem foi administrada por três dias com o objetivo de redução da dor pós-operatória.

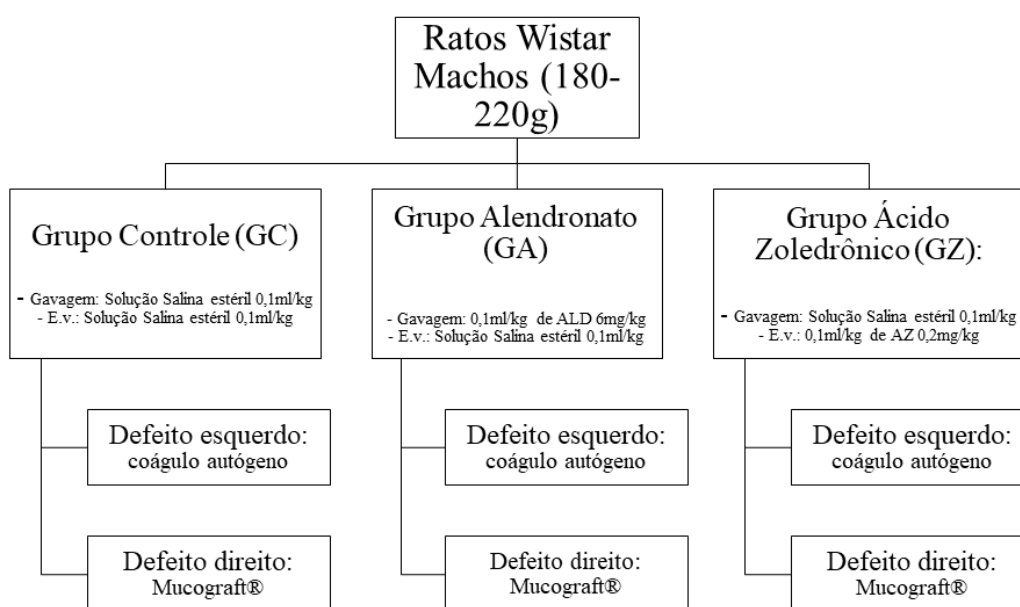


Figura 3: Desenho experimental do estudo exibindo grupos e subgrupos de ratos Wistar submetidos a confecção de defeito crítico em ramo de mandíbula e administração de solução salina estéril, ALD ou AZ tratados ou não com Mucograft®.

3.5. Análise Radiográfica digital

Após a eutanásia (dia 70) e fixação por 48h em formol tamponado 10% as hemimandíbulas esquerda (controle) e direita (Mucograft®) foram radiografadas pelo Sistema de Imagem Digital Digora® Instrumentarium Express onde as peças foram dispostas com seu maior eixo paralelo à película digital e o localizador posicionado perpendicularmente. A distância localizador-película radiográfica será fixada em 10cm

e o tempo de exposição em 0.18 segundos na função de radiografia digital para dentes anteriores (13-11;21-23) (DabiAtlante® Spectro 70X Seletronic).

As imagens foram analisadas os parâmetros de tamanho das áreas radiolúcidas.

3.6. Confecção de lâminas histológicas e análise histopatológica

Após as tomadas radiográficas as hemimandíbulas foram descalcificadas em Ácido Etilenodiamino Tetra-acético 10%, pH 7,4 (NaOH), seis semanas com trocas a cada 10 dias. Posteriormente, o material foi hemisseccionado cortado e submetido ao processamento histológico através do Sistema Automatizado PT05 LupTec® para confecção de lâminas histológicas com fragmentos de 4 µm de espessura, os quais foram corados por Hematoxilina-eosina para avaliação histológica por microscopia de luz convencional.

As lâminas foram descritas qualitativamente e foram fotografados 10 campos em aumento de 400x para posterior contagem de lacunas de osteócitos viáveis e vazios para cálculo do percentual de lacunas de osteócitos vazias, osteoclastos viáveis e apoptóticos para cálculo do percentual de osteoclastos apoptóticos, além de polimorfonucleares neutrófilos e mononucleares (SILVA et al., 2016).

3.7. Análise estatística

As variáveis foram submetidas aos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, expressas em forma de média±EPM e analisadas por meio dos testes ANOVA 1-way ou 2-way seguido do pós-teste de Bonferroni (dados paramétricos) ou Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn (dados não paramétricos). Todas as análises foram realizadas utilizando o software estatístico GraphPad Prism® 5.0 e o índice de significância $p < 0.05$ será adotado em todas as avaliações.

4. RESULTADOS

4.1. Tratamento com ALD ou AZ não modifica perfil de ganho de massa corpórea em ratos submetidos a modelo de defeito semi-crítico em mandíbula de ratos

Todos os animais apresentaram ganho de massa corpórea ao longo do experimento, redução significativa no dia 49, uma semana após o procedimento cirúrgico, e retorno ao ganho ponderal até o dia 70 ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os três grupos experimentais ao longo do estudo ($p = 0,740$) (Figura 4)

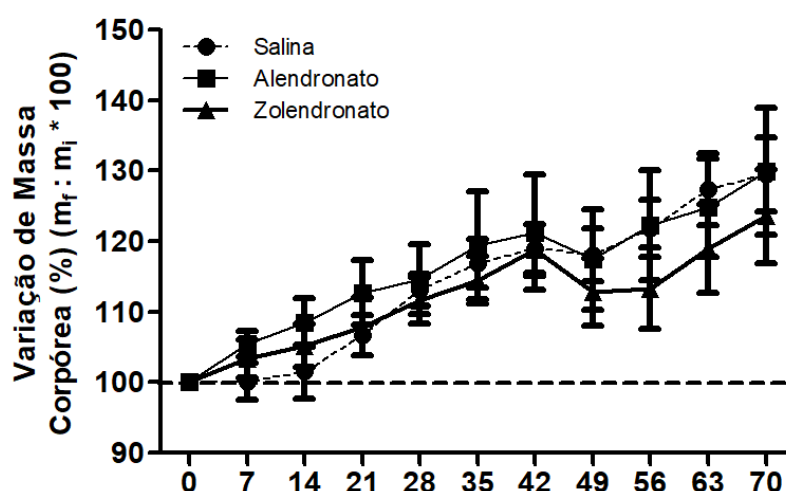


Figura 4: Variação de massa corpórea de ratos tratados com solução salina, ALD ou AZ e submetidos a modelo de defeito semi-crítico em ramo de mandíbula.

* $p < 0,05$, teste ANOVA-2way-para-medidas-repatidas/Bonferroni (média $\pm$ EPM).

4.2. Tratamento com Mucograft® acelera cicatrização tecidual, porém, não reduz aspectos imagiológicos de OMB

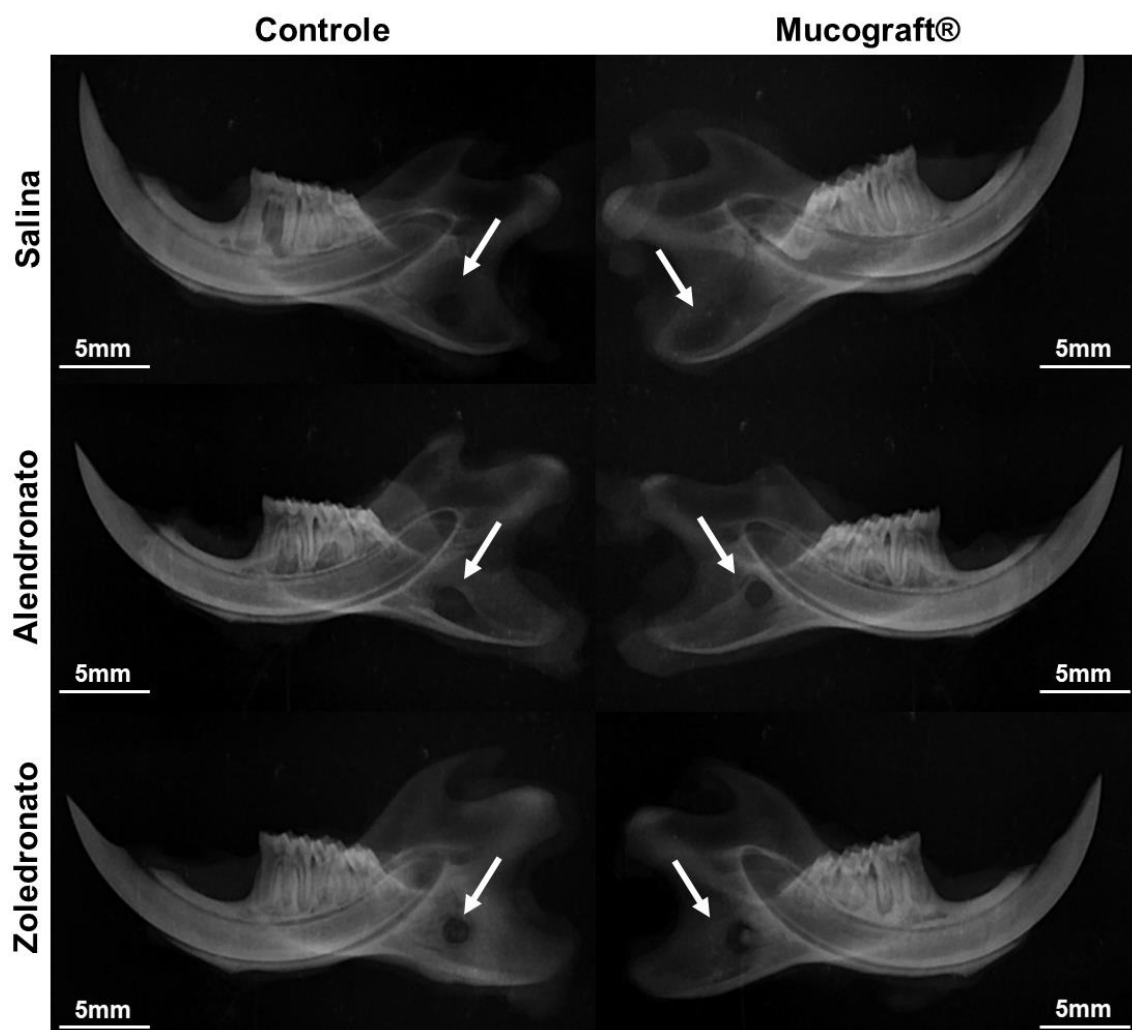


Figura 5: Análise radiográfica da mandíbula de ratos tratados com solução salina, ALD ou AZ e submetidos a modelo de defeito semi-crítico em ramo de mandíbula tratados ou não com Mucograft®.

A análise radiográfica exibiu no GC área radiolúcida difusa com bordos bem definidos no lado controle e total reparo tecidual no lado Mucograft®. No GA, em ambos os lados pôde-se observar lesão radiolúcida de bordos irregulares no ramo da mandíbula, apresentando menor dimensão no lado Mucograft®. No GZ em ambos os lados pôde-se observar lesão radiolúcida de bordos irregulares, no entanto, discreta área de neoformação óssea nas bordas da lesão.

4.3. Tratamento com Mucograft® modifica perfil infiltrado inflamatório local, porém, não reduz aspectos histológicos de OMB

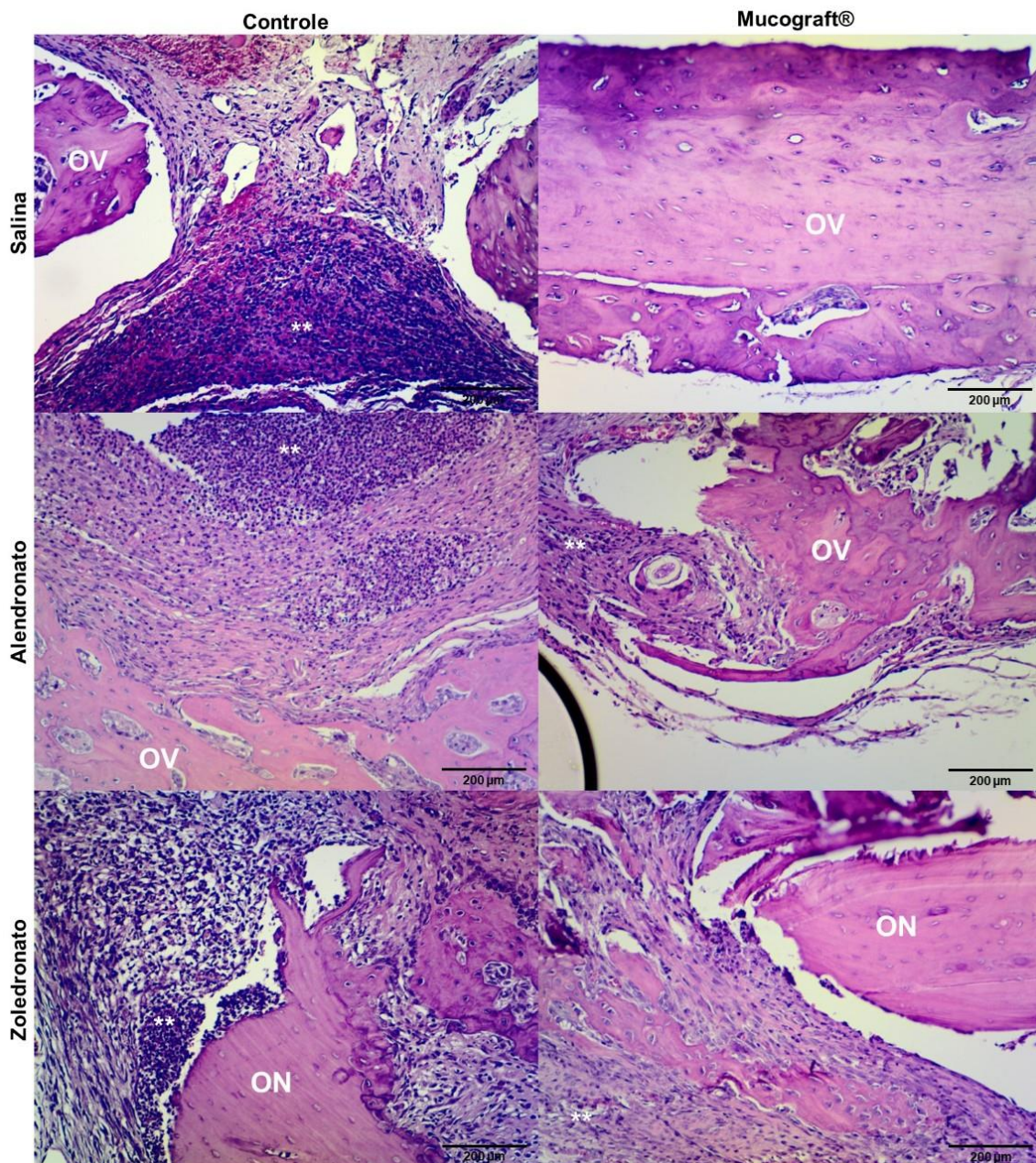


Figura 6: Análise microscópica da mandíbula de ratos tratados com solução salina, ALD ou AZ e submetidos a modelo de defeito semi-crítico em ramo de mandíbula tratados ou não com Mucograft® (HE, 40x). ** Infiltrado Inflamatório, OV Osso Vitalizado, ON Osso Necrosado.

Histologicamente, os resultados foram similares, com total neoformação óssea no GC tratado com Mucograft® em comparação ao lado controle que apresentava discreto infiltrado inflamatório e defeito ainda aberto. No GA e no GZ intenso infiltrado inflamatório foi observado nos lados controle associado a retardo de reparo ósseo e tecido ósseo desvitalizado, respectivamente.

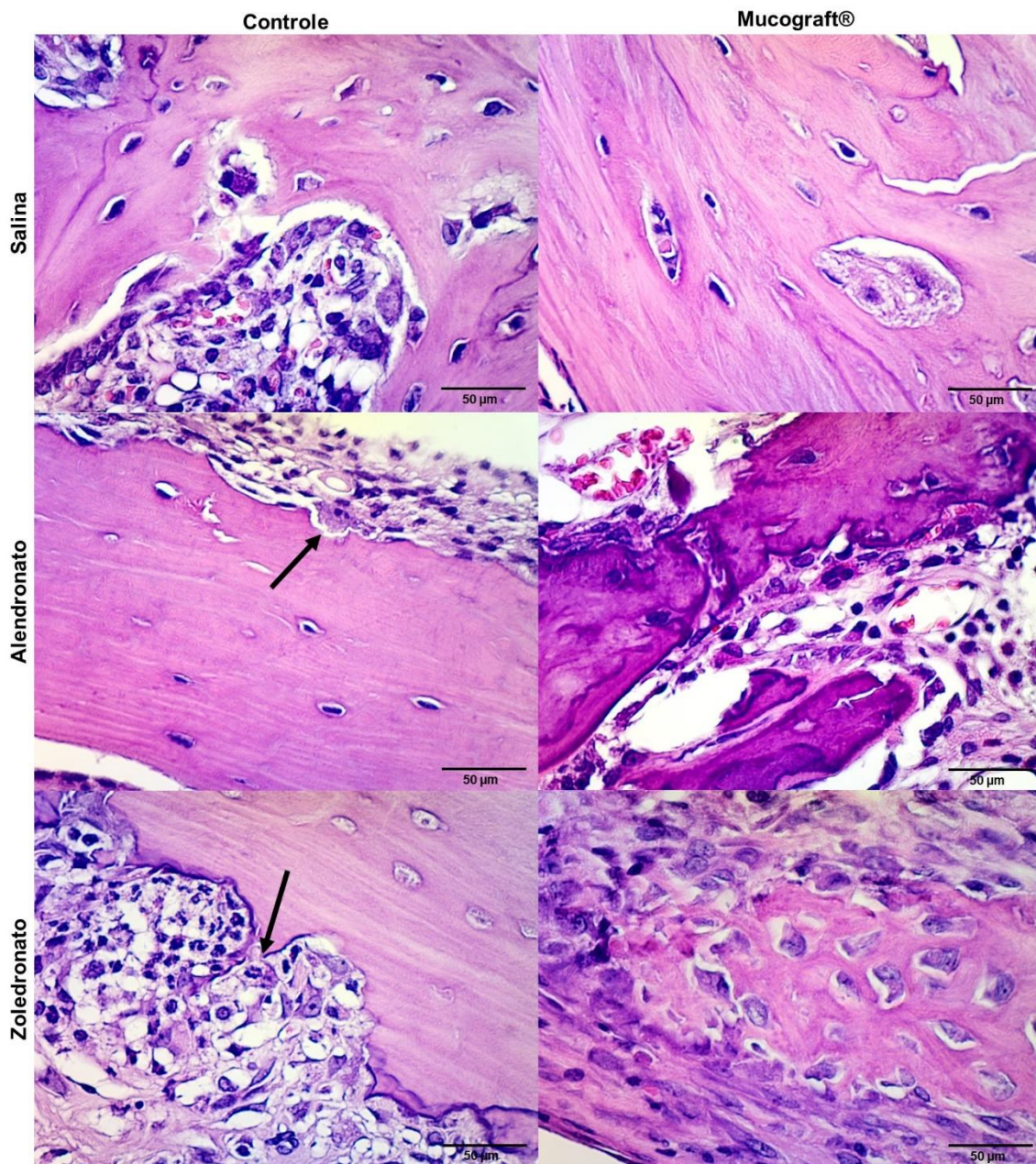


Figura 7: Análise microscópica da mandíbula de ratos tratados com solução salina, ALD ou AZ e submetidos a modelo de defeito crítico em ramo de mandíbula tratados ou não com Mucograft® (HE, 400x). ** Infiltrado Inflamatório, seta preta: osteoclasto apoptótico.

No lado Mucograft® discreto infiltrado inflamatório associado igualmente a a retardo de reparo ósseo e tecido ósseo desvitalizado, respectivamente pôde ser observado. Conclusão: O uso da matriz de colágeno Mucograft® acelerou o reparo

ósseo no GC e reduziu sinais imaginológicos de OMB nos grupos GA e GZ, sem interferir no retardo do reparo ósseo e na OMB, respectivamente.

Tabela 1: Perfil celular da mandíbula de ratos tratados com solução salina, ALD ou AZ e submetidos a modelo de defeito semi-crítico em ramo de mandíbula tratados ou não com Mucograft®.

	Grupo experimental			p-Valor ^a
	Salina	GA	GZ	
Lacunas de osteócitos vazias (%)				
Controle	13,2±0,5	42,9±4,3*	46,8±10,7*	0,025
Mucograft®	11,0±2,3	48,1±5,6*	41,1±5,3*	0,003
p-Valor^b	0,269	0,540	0,732	
Osteoclastos (n)				
Controle	2,0±1,5	2,7±1,2	1,8±0,7	0,842
Mucograft®	2,0±0,9	2,5±0,5	3,0±1,7	0,829
p-Valor^b	1,000	0,892	0,523	
Osteoclastos apoptóticos (%)				
Controle	0,0±0,0	22,5±13,1	62,5±21,6*	0,036
Mucograft®	0,0±0,0	33,3±20,1	62,6±18,5*	0,034
p-Valor^b	1,000	0,722	1,000	
Polimorfonucleares neutrófilos				
Controle	0,2±0,1	44,3±12,5*	41,6±14,0*	0,004
Mucograft®	0,0±0,0	16,7±5,4*	18,6±1,6*	<0,001
p-Valor^b	1,000	0,035	0,034	
Mononucleares (n)				
Controle	0,0±0,0	15,7±8,1	16,5±10,2	0,446
Mucograft®	0,0±0,0	14,0±8,0	19,8±5,9	0,071
p-Valor^b	1,000	0,925	0,777	
Células inflamatórias (n)				
Controle	0,2±0,1	86,7±23,7*	85,0±17,3*	<0,001
Mucograft®	0,0±0,0	30,7±10,5*	38,4±5,4*	<0,001
p-Valor^b	1,000	0,026	0,005	

^aTeste ANOVA/Bonferroni; ^bTeste t de Student; *p<0,05 versus salina; †p<0,05 versus ALD (média±EPM)

O percentual de lacunas de osteócitos vazias se mostrou significativamente aumentado nos grupos GA e GZ em relação ao grupo tratado com solução salina, tanto para os animais controle ($p=0,025$) como para os animais com a membrana Mucograft® ($p=0,003$). Não houve diferença significativa entre o percentual de lacunas de osteócitos viáveis entre os grupos Controle e Mucograft® tratados com salina ($p=0,269$), alendronato ($p=0,540$) e zoledronato ($p=0,732$) (Tabela 1).

O número total de osteoclastos não diferiu nos grupos experimentais controle ($p=0,842$) e Mucograft® ($p=0,829$). A implantação da membrana Mucograft® não alterou o número de osteoclastos nos grupos salina ($p=1,000$) ou tratados com Alendronato ($p=0,892$) ou Zoledronato ($p=0,523$). O número de osteoclastos apoptóticos se mostrou aumentado nos grupos tratados com Zoledronato submetidos ($p=0,034$) ou não ($p=0,036$) a implantação da membrana Mucograft®. Não houve diferença no percentual de osteoclastos apoptóticos após implantação da membrana nos grupos tratados com salina ($p=1,000$), alendronato ($p=0,722$) ou zoledronato ($p=1,000$) (Tabela 1).

Os animais tratados com Alendronato e Zoledronato mostraram aumento do número de polimorfonucleares em comparação com o grupo tratado com salina, tanto para o lado controle ($p=0,004$) como para o lado Mucograft® ($p<0,001$). No entanto, no lado Mucograft® o número de polimorfonucleares foi significativamente inferior tanto nos animais tratados com alendronato ($p=0,035$) como nos animais tratados com Zoledronato ($p=0,034$) (Tabela 1).

Não houve diferença na contagem de células mononucleares entre os grupos experimentais ($p>0,05$), porém os animais tratados com Alendronato e Zoledronato mostraram aumento significativo do número de células inflamatórias em relação ao grupo salina tanto do lado controle ($p<0,001$) como do lado Mucograft® ($p<0,001$). A implantação da membrana Mucograft® reduziu significativamente o número de células inflamatórias tanto nos animais tratados com Alendronato ($p=0,026$) como nos animais tratados com Zoledronato ($p=0,005$) (Tabela 1).

5. DISCUSSÃO

As membranas de colágeno também são aplicadas a regeneração óssea de defeitos na região peri-implante chamando o procedimento de Regeneração Óssea Guiada (ROG). (BUNYARATAVEJ P; WANG HL, 2001). No entanto, não existem estudos relatando o uso de membranas de colágeno para regenerações de lesões de Osteonecrose induzidas pelo uso de Bisfosfonatos. A Osteonecrose Maxilar induzida pelo uso de Bisfosfonatos é uma séria complicação do tratamento com Bisfosfonatos. Essa condição está associada a procedimentos cirúrgicos orais menores contaminados, como a exodontia. Nesse contexto, presente estudo foi desenvolvido objetivando avaliar o efeito de remodelação óssea da matriz de colágeno Mucograft® em modelo de osteonecrose dos maxilares induzida pelo uso de Alendronato (ALD) ou Ácido Zoledrônico (AZ) em defeito semi-crítico em ramo mandibular de ratos.

O principal fator de risco à OMB é o trauma cirúrgico. A exodontia é o principal procedimento associado que aumenta sua prevalência de 17 até 299 vezes a mais e até mesmo procedimentos odontológicos não invasivos, como o tratamento endodôntico, aumentam o risco de desenvolvimento dessa doença (BARASCH et al., 2011). Com esses dados procedimentos cirúrgicos maiores são evitados em pacientes em uso de BPs, todavia, grandes procedimentos cirúrgicos são a primeira linha de tratamento para a OMB (RUPEL et al., 2014).

RUPEL et al. (2014) em uma revisão sistemática da literatura demonstrou que a remoção cirúrgica não conservadora de osso necrótico é o tratamento que apresenta a maior taxa de sucesso no que diz a recobrimento do defeito de tecido mole, mas que não impede a recidiva da lesão em longos prazos de follow up. Assim, compreender mecanismos pelos quais procedimentos cirúrgicos maiores podem contribuir ou induzir a OMB e propor formas de evitar esse processo é indispensável.

No presente estudo, foi possível observar desenvolvimento de OMB tanto em animais tratados com ALD por via oral como nos animais tratados com AZ, um BP muito mais potente (HOERFERT et al., 2016). MAAHS et al. (2011) em modelo com exodontia não conseguiu induzir OMB em ratos tratados com Bisfostonatos menos potentes, obtendo apenas retardo na cicatrização óssea, ao passo que o tratamento com AZ induziu prontamente a OMB após exodontia. A OMB é diretamente relacionada a aumento da expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias (SILVA et al., 2016) e

quando maior a extensão de uma cirurgia maior a produção de citocinas e moléculas das cascatas inflamatórias (SANTANA-SANTOS et al., 2013). A OMB demonstra ser dependente da potência (MAAHS et al., 2011) da dose do BF (SILVA et al., 2015), assim, para procedimentos cirúrgicos menores induzirem OMB parece ser necessário o uso de BP em altas doses e elevadas potências associadas a procedimentos altamente invasivos (BARASCH et al., 2011).

Os achados radiográficos demonstraram uma zona de radiolucidez sugestiva de atraso no reparo ósseo. Esses achados se assemelham a diversos estudos que mostram que o metabolismo ósseo está prontamente inibido, sob ponto de vista imaginológico, independente da dose de Bisfosfonato utilizada (PAUTKE et al., 2012; BIASOTTO et al., 2010; CANKAYA et al., 2011).

Histologicamente os grupos tratados com ALD e AZ mostraram aumento significativo do percentual de lacunas de osteócitos vazias e do percentual de osteoclastos apoptóticos. Esses parâmetros são importantes achados histológicos sugestivos de necrose óssea (SILVA et al., 2015). Portanto, foi constatado instalação de OMB no defeito ósseo no ramo da mandíbula dos ratos.

Tem sido sugerido que a infecção é um importante fator etiológico da OMB, especialmente pelo fato de a cavidade oral ser um meio altamente contaminado. Porém, no presente modelo, infecção não esteve presente de um ponto de vista histológico e não houve contato entre o sítio cirúrgico, de acesso puramente extraoral, e a cavidade oral (LÓPEZ-JORNET et al., 2010).

Intenso infiltrado inflamatório predominantemente composto por neutrófilos pôde ser observado. Esse achado também foi descrito em estudos prévios (SILVA et al., 2015; SILVA et al., 2016) o que faz dessas células prováveis preditoras do desenvolvimento de OMB. Mesmo Bisfosfonatos de menor potência como o ALD causam neutrofilia (NORTON et al., 2012) e diversos marcadores pró-inflamatórios que estão relacionados a OMB são quimiotáticos para neutrófilos (BAGAN et al., 2013; TSAO et al., 2013; BAGAN et al., 2014). Porém, essas células apresentam meia vida encurtada na presença de BF o que aumenta o estresse oxidativo local (KUIPER et al., 2012), potencializando a apoptose de osteócitos (SILVA et al., 2016).

A membrana foi capaz de promover reparo ósseo quando comparado com o lado que não recebeu a membrana. Ou seja, em situação de normalidade, mostrou-se efetiva em promover neoformação óssea em defeito semi-crítico de ramo mandibular.

O tratamento com a membrana a base de colágeno Mucograft® conseguiu promover um reparo ósseo adequado nos grupos tratados com Bisfosfonatos, o que pode ser parcialmente justificado pela natureza compacta dessa matriz de colágeno que causa um processo de vascularização lento devido a sua superfície apresentar baixa porosidade, o que pode afetar negativamente a quantidade de osso neofomado. (GHANNTI et al, 2011). A Mucograft® não conseguiu reverter a OMB, entretanto, reduziu significativamente o infiltrado polimorfonuclear em defeitos ósseos de ratos tratados com Bisfosfonatos. Tal achado corrobora com os estudos de Ghanaati et al (2011) que observaram ausência de células gigantes multinucleadas, tecido de granulação ou mesmo uma marcante resposta inflamatória quando usada a membrana Mucograft® em defeitos de calvária de ratos.

KASAJ et al. (2008), sugerem que as membranas de colágeno testadas em tecido ósseo melhoraram a proliferação de fibroblastos e células semelhantes a osteoblastos humanos, o que juntamente com a função de barreira apoia a neoformação óssea e cicatrização no tecido ósseo não tratado farmacologicamente. Nos animais não tratados com AZ submetidos a Mucograft® total reparo ósseo o que entra de acordo com o processo sugerido por ZELLIN et al. (1995) que ressaltam que materiais de membrana biodegradáveis induzem neoformação óssea nas bordas de um defeito prosseguindo em direção ao seu centro, sendo que esse processo é dependente da taxa de revascularização e recrutamento de osteoblastos.

Osteócitos e osteoblastos são as células mais abundantes do tecido ósseo participando dos ciclos de remodelação e mineralização óssea. Assim, as propriedades osteocondutoras da membrana testada podem ser as principais responsáveis pelos achados imagiológicos e histológicos deste estudo (PANAZIANAS et al., 2014)

Fibras colágenas funcionam como arcabouço para adsorção de plaquetas, fibrina, diversas moléculas de adesão celular, fatores quimiotáticos, fatores de crescimento e outros componentes das matrizes extracelulares, influenciando processos biológicos da cicatrização importantes como a quimiotaxia, diferenciação e proliferação celular. (BUNYARATAVEJ et al., 2001). A maioria desses mediadores, como TGF- β , PDGF, entre outros, possuem propriedades anti-inflamatórias, podendo ter contribuído com a redução do processo inflamatório no sítio cirúrgico observado no presente estudo (BALBINO et al, 2005).

O uso de membranas pode acelerar a cicatrização óssea (STRIETZEL et al., 2006), particularmente durante os estágios iniciais da regeneração (LEE et al., 2018).

Estudos clínicos analisando o perfil da membrana Mucograft® em regeneração óssea guiada são escassos. Stankovic et al. (2018) publicaram uma nota técnica na qual a membrana Mucograft® associada ao Bio-Oss e Bio-Guide foi eficiente em propiciar neoformação óssea. Porém, nenhum estudo concentrou seus achados em tecidos ósseos tratados com BPs. Tal achado enfatiza a importância da presente pesquisa experimental, a qual é aparentemente inédita.

Embora em animais saudáveis a membrana de colágeno utilizada tenha sido satisfatória para promover reparo ósseo, o tratamento com Mucograft® não foi capaz de reverter a OMB em modelo de defeito semi-crítico em ramo mandibular de ratos, mas mostrou estar associada a redução do processo inflamatório agudo em um grande defeito ósseo em mandíbula de ratos tratados com BPs venosos ou orais (ALD e AZ, respectivamente). Assim, apesar das limitações dos estudos animais por sua distância da biologia humana e do curto período de avaliação decorrente do uso de um modelo de procedimento cirúrgico menor (exodontia), parece ser bastante promissor o uso de membranas de colágeno no controle do processo inflamatório de grandes procedimentos cirúrgicos após tratamento com BPs.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que o defeito semi- críticos realizado por acesso extraoral em ramo de mandíbula de ratos induz OMB imaginológica e histologicamente independente da potência do BPs e que o uso da matriz de colágeno Mucograft®, apesar de não impedir o desenvolvimento de OMB, reduziu o infiltrado inflamatório local. Mais estudos são necessários com diferentes tempos de avaliação e com a incorporação de moléculas de uso potencial em membranas a base de colágeno como a associação de osso liofilizado com Mucograft® com a finalidade de desenvolver materiais para apoio ao tratamento cirúrgico da OMB.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHALOO et al. Periodontal Disease and Bisphosphonates Induce Osteonecrosis of the Jaw in Rat. *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol 26, n08, pp1871-1882. August 2011.
- AGUIRRE, JI et al. Effects of alendronate on bone healing after tooth extraction in rats. *Oral Diseases*, 16, 674-685. 2010
- AGUIRRE, JI et al. Oncologic Doses of Zoledronic Acid Induce Osteonecrosis of the Jaw-Like Lesions in Rice Rats (*Oryzomys Palustris*) with Periodontitis. *J Bone Miner Res*, 27(10): 2130–2143. October 2012
- ALGIRDAS Puišys, SAULIUS Žukauskas, RICARDAS Kubilius, EGLE Vindašiūtė, TOMAS Linkevičius. Bone augmentation and simultaneous soft tissue thickening with collagen tissue matrix derivate membrane in an aesthetic area. A case report. *Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal*, 18: 64-8, 2017
- ALLEN and BURR. Pathogenesis of BRONJ. *J. Oral Maxillofac. Surg* 2009.
- B LANGDAHL, S FERRARI et al. Bone modeling and remodeling: potential therapeutic targets for the treatment of Osteoporosis. *Ther Adv Musculoskel Dis*. 2016.
- BAGAN, J. et al. Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaws: a preliminary study of salivary interleukins. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 42, n.5, p. 405-408, 2013.
- BAGAN, J. et al. Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaws: a preliminary study of salivary interleukins. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 42, n.5, p. 405-408, 2013.
- BAGAN, J; SÁEZ, G.T; TORMOS, M.C; HENS, E.; TEROL, M.J; BAGAN, L.; DIAZ-FERNÁNDEZ, J.M.; LLUCH, A.; CAMPS, C. Interleukin-6 concentration changes in plasma and saliva in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Oral Diseases*, v. 20, n. 5, p. 446-452, 2014.
- BALBINO et al. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 41, n. 1, jan./mar., 2005.
- BARASCH, A.; CUNHA-CRUZ, J., CURRO, F. A.; HUJOEL, P.; SUNG, A. H.; VENA, D.; VOINEA-GRIFFIN, A. E.; BEADNELL, S.; CRAIG, R. G.; DeROUEN, T.; DESARANAYAKE, A.; GILBERT, A; GILBERT, G. H.; GOLDBERG, K.; HAULEY, R.; HASHIMOTO, M.; HOLMES, J.; LATZKE, B;

- LEROUX, B.; LINDBLAD, A.; RICHMAN, J.; SAFFORD, M.; SHIP, J.; THOMPSON, V. P.; WILLIAMS, O. D.; YIN, W. Risk factors for osteonecrosis of the jaws: a case-control study from the CONDOR dental PBRN. *Journal of Dental Research*, v. 90, n. 4, p. 439-444, 2011.
- BARROS Mourão, et al. Tooth injury in anaesthesiology. *Rev Brasileira de Anesthesiologia* 65(6):511-8 Nov-Dec 2015.
- BI Y et al. Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw – like disease in mice. *The American of Pathology*, Vol. 177, n1, July 2010.
- BIASOTTO et al. A novel animal model to study non-spontaneous bisphosphonates osteonecrosis of jaw. *J. Oral Pathol Med*, 39: 390-396, 2010
- BILEZIKIAN JP. Osteonecrosis of the jaw. Do Bisphosphonates pose a risk? *N Engl J Med*; 355:2278–2281.2006
- BORGIOLO et al. Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw: Clinical and physiopathological considerations. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2009.
- BROZOSKI et al. Osteonecrose maxilar associada ao uso de bisfosfonatos. *Rev Bras Reumatol* ;52(2):260-270, 2012.
- BUNYARATAVEJ P, WANG HL. Collagen membranes: a review. *Journal of Periodontology*, v.72, n.2, p. 215-219, Feb. 2001.
- CANKAYA, A. B.; ERDEM, M. A.; ISLER, S. C.; DEMIRCAN, S.; SOLUK, M.; KASAPOGLU, C.; ORAL, C. K. Use of cone-beam computerized tomography for evaluation of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in an experimental rat model. *International Journal of Medical Sciences*, v. 8, n. 8, p. 667-672, 2011.
- CONTE N et al. Experimental development of bisphosphonates- related osteonecrosis of the jaw in rodents. *Int. J. Exp. Path.*, 94 , 65-73, 2013.
- CORTELLINI P et al. Periodontal regeneration of human intrabony defects with bioresorbable membranes. A controlled clinical trial. *J Periodontol* , 67:217-223, 1996.
- COXON FP et al. Protein geranylation is required for osteoclast formation, function, and survival: inhibition by bisphosphonates and GGTI-298. *J Bone Miner Res* 15: 1467-76. 2000
- COXON FP et al. Visualizing mineral binding and uptake of bisphosphonate by osteoclasts and non-resorbing cells. *Bone* 42: 848-60. 2008

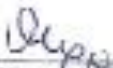
- FONSECA FP et al. Alendronate-associated osteonecrosis of the jaws: A review of the main topics. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 1;19 (2): 106-11. 2014 Mar
- GALITIS et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw: definition and best practice for prevention, diagnosis, and treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* (2018).
- GARRET, S. Periodontol regeneration around natural teeth. *Annals of Periodontology*,v.1, p. 621-666, 1996
- GONEN, YILMAZ Asan. Treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw using platelet rich fibrin. *The Journal of Craniomandibular & Sleep Practice* 13-14 (2016).
- HERFORD et al. Use of a Porcine Collagen Matrix as an Alternative to Autogenous Tissue for Grafting Oral Soft Tissue Defects. *J Oral Maxillofac Surg* 68:1463-1470, 2010.
- HOEFERT S et al, (2016). Effect of bisphosphonates on macrophagic THP-1 cell survival in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 121: 222-32. 2016.
- HONG, YC et al. Efficacy of Alendronate for Preventing Collapse of Femoral Head in Adult Patients with Nontraumatic Osteonecrosis. *BioMed Research International*. Volume 2014.
- HUJA SS et al. Zoledronic acid decreases bone formation without causing osteocyte death in mice. *Archives of Oral Biology* 54 , 851-856. 2009
- JEONG HG et al. Risk factors of osteonecrosis of the jaw after tooth extraction in osteoporotic patients on oral bisphosphonates. *Imaging Science in Dentistry* ; 47: 45-50. 2017.
- KASAJ S, et al. *In vitro* evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. *Head & Face Medicine*, n.14, p. 4-22, 2008.
- KOBAYASHI et al. Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice. *J Bone Miner Metab* 28:165–175. 2010.
- LEE et al. Delayed bone healing by collagen membrane in early phase of four weeks. *The End-to-end Journal* (2018),

- LÓPEZ-JORNET, P.; CAMACHO-ALONSO, F.; MOLINA-MIÑANO, F.; GÓMEZ-GARCÍA, F.; VICENTE-ORTEGA, V. An experimental study of bisphosphonate-induced jaws osteonecrosis in Sprague-Dawley rats. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 39, n. 9, p. 697-702, 2010.
- MAAHS, M. P., AZAMBUJA, A. A., CAMPOS, M. M., SALUM, F. G., CHERUBINI, K. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats. *Head & Neck*, v. 33, n. 2, p. 199-207, 2011.
- MARTIN TJ, GILL V: Bisphosphonates–Mechanism of action. *Experimental and clinical pharmacology*. *Auctr Preser* 23:130, 2000.
- MARX et al. Bisphosphonate-Induced Exposed Bone (Osteonecrosis/Osteopetrosis) of the Jaws: Risk Factors, Recognition, Prevention, and Treatment. *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeon J Oral Maxillofac Surg* 63:1567–1575, 2005
- MIGLIORATI, CA et al. Treatment of bisphosphonates-associated osteonecrosis. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* ; 4(1): 62-68. 2007.
- NAIR, AB; JACOB, S. An update overview on therapeutic drug monitoring. *Drug in R&D*, 16(4), 303-316, 2016.
- NEWMAN, S. L.; HENSON, J. E.; HENSON, P. M. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. *J. Exp. Med.*, v. 156, p. 430-442, 1992.
- NORTON, J. T.; HAYASHI, T.; CRAIN, B.; CHO, J. S.; MILLER, L. S.; CORR, M.; CARSON, D. A. Cutting edge nitrogen bisphosphonate-induced inflammation is dependent upon mast cells and IL-1. *Journal of Immunology*, v. 188, n. 7, p. 2977-2980, 2012
- O'RYAN FS, JOAN C. Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw in Patients With Oral Bisphosphonate Exposure: Clinical Course and Outcomes. *J Oral Maxillofac Surg* 70:1844-1853, 2012.
- O'RYAN, FS et al. Prevalence of Osteonecrosis of the Jaw in Patients With Oral Bisphosphonate Exposure. *J Oral Maxillofac Surg* 68:243-253, 2010
- PAUTKE, C.; KREUTZER, K.; WEITZ, J.; KNÖDLER, M.; MÜNZEL, D.; WEXEL, G.; OTTO, S.; HAPFELMEIER, A.; STÜRZENBAUM, S.; TISCHER, T. Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw: A minipig large animal model. *Bone*, v. 51, p. 3, p. 592-599, 2012.

- RAFAEL et al. Evaluation of the Biological Behavior of Mucograft in Human Gingival Fibroblasts- An in vitro Study. Brazilian Dental Journal 26(6): 602-6, 2015.
- RAMAGLIAN, S, et al. Efficacy of Mucograft vs Conventional Resorbable Collagen Membranes in Guided Bone Regeneration Around Standardized Calvarial Defects in Rats: A Histological and Biomechanical Assessment. The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry. Vol 36 (2016).
- RUGGUIERO et al: Medication-related osteonecrosis of the jaw e 2014 update. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons e AAOMS, 2014.
- RUGGUIERO et al: Osteonecrosis of the Jaws Associated with the use of Bisphosphonates. A Review of 63 cases. J Oral Maxillofac Surg 62:527-534, 2004.
- RUPEL, K.; OTTAVIANI, G.; GOBBO, M.; CONTARDO, L.; TIRELLI, G.; VESCOVI, P.; DI LENARDA, R.; BIASOTTO, M. A systematic review of therapeutical approaches in bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). Oral Oncology v. 50, n. 11, 1049-1057, 2014.
- SANTOS Thiago Santana et al. Prediction of postoperative facial swelling, pain and trismus following third molar surgery based on preoperative variables. Med Oral Patol Oral Cir Bucal; 18(1): 65–70. 2013 Jan
- SANZ Mariano et al. Clinical evaluation of a new collagen matrix (Mucografts prototype) to enhance the width of keratinized tissue in patients with fixed prosthetic restorations: a randomized prospective clinical trial. Clin Periodontol; 36: 868–876. 2009
- SILVA et al. Effect of diferente doses of zolendronic acid in establishing of bisphosphonate- related osteonecrosis. Archives of Oral Biology 60 (2015) 1237-1245
- SILVA et al. Immune cellular profile of bisphosphonate- related osteonecrosis of the jaw. Oral Diseases (2016)
- SONIS, ST et al. Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. Oral Oncol;45(6):164–72. 2009.
- STRIETZEL FP et al. Healing pattern of bone defects covered by different membrane types—a histologic study in the porcine mandible. J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomaterial.;78:35-46.2006.

- TSAO, C.; DARBY, I.; EBELING, P. R.; WALSH, K.; O'BRIEN-SIMPSON, N.; REYNOLDS, E.; BORROMEO, G. Oral Health Risk Factors for Bisphosphonate-Associated Jaw Osteonecrosis. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2013.
- WILLERSHAUSEN Ines, Mike BARBECK, Nicole BOEHM, Robert SADER, Brita WILLERSHAUSEN, Charles James. Non-cross-linked collagen type I/III materials enhance cell proliferation: in vitro and in vivo evidence. *J Appl Oral Sci.*;22(1):29-37. 2014.
- ZELLIN G, et al. Healing of mandibular defects with different biodegradable and non-biodegradable membranes: an experimental study in rats. *Biomaterials*, v.16, n.8, p. 601-609, 1995.
- ZUSHI et al. Treatment with teriparatide for advanced bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw around dental implants: a case report *International Journal of Implant Dentistry*, 3:11. 2017.

8. ANEXO 1

CEJA INSTITUTO PARA DESENVOLVIMENTO DA EDUCAÇÃO LTDA IPADE CENTRO UNIVERSITÁRIO CRISTUS			
			
UI No: 090/17			
Protocolo da CEJA: 048/17			
Pesquisador Responsável: Prof. RAFAEL LIMA DE AVELAR			
Título do Projeto: EFEITO DO PLASMA FICO EM FIBRINA (PRF) EM MODELO DE OSTEOMECLOSE DOS MAXILARES INDUZIDA POR BIFOSFONATOS EM DEFICITO CRÍTICO EM RAMO MANDIBULAR DE RATOS			
Levamos ao conhecimento de V. Sa que a Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA – IPADE considerou <u>APROVADO</u> o projeto apresentado na reunião de dia 24 (vinte e quatro) de agosto de 2017.			
Descrição do animal utilizado:			
Espécie:	Rattus norvegicus	Numero Animal:	33
Resíduos parciais e finais devem ser apresentados ao CEJA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE ao término do estudo, prazo máximo 24/08/2018.			
Foi lida, em 24 de agosto de 2017,			
			
Cláudia Vale Oliveira-Machado Coordenadora CEJA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE			