

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

CAMILA PEREIRA DE ABREU

AVALIAÇÃO DOS OSTEOCLASTOS EM DUAS
MODALIDADES DE TRATAMENTO DA OSTEONECROSE
DOS MAXILARES ASSOCIADA AO USO DE
BISFOSFONATOS

BAURU
2019

CAMILA PEREIRA DE ABREU

**AVALIAÇÃO DOS OSTEOCLASTOS EM DUAS
MODALIDADES DE TRATAMENTO DA OSTEONECROSE
DOS MAXILARES ASSOCIADA AO USO DE
BISFOSFONATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para a obtenção de título de bacharel em odontologia – Universidade do Sagrado Coração.

Orientador: Prof.^a Dra. Camila Lopes Cardoso.

BAURU
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo
com ISBD

A162a	<p>Abreu, Camila Pereira de</p> <p>Avaliação dos osteoclastos em duas modalidades de tratamento da osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos/ Camila Pereira de Abreu. -- 2019. 21f. : il.</p> <p>Orientador: Prof.^a Dra. Camila Lopes Cardoso</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP</p> <p>1. Osteonecrose. 2. Plasma Rico em Plaquetas. 3. Osteoclasto. I. Cardoso, Camila Lopes. II. Título.</p>
-------	---

RESUMO

Diante da escassez de estudos microscópicos detalhando aspectos de remodelação óssea em áreas de osteonecrose medicamentosa dos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos (OMMBF) tratadas, a proposta deste estudo foi quantificar os osteoclastos em duas diferentes formas de tratamento para a OMMBF: ressecção óssea marginal com e sem plasma rico em plaquetas (PRP). Foram utilizados 30 ratos, que receberam administração endovenosa de ácido zoledrônico na veia caudal (4 doses). Após 8 semanas, foi realizada a exodontia do incisivo central superior direito e acompanhado seu reparo alveolar. Após a constatação clínica da OMMBF, foi realizado o tratamento cirúrgico dividido em dois grupos, contendo 15 animais cada: Grupo 1 (G1): submetido à curetagem alveolar e ressecção óssea marginal seguida da inserção de PRP e Grupo 2 (G2): mesmo procedimento, porém sem PRP. Após 14, 28 e 42 dias, os animais foram eutanasiados e a maxila foi dissecada, fixada e incluída em blocos de parafina para confecção das lâminas que foram submetidas aos procedimentos imunoistoquímicos com o marcador anti-TRAP, o qual foi utilizado para a contagem dos osteoclastos. Não foi identificada uma diferença significativa na comparação dos grupos com PRP e sem PRP, $p=0,195$, nem diferença significativa na comparação dos tempos 14, 28, 42, $p=0,089$, independentemente do grupo avaliado. Através deste estudo, as formas de tratamento comparadas (com e sem PRP) não influenciaram na quantidade de osteoclastos.

Palavras-Chave: Osteonecrose. Plasma rico em plaquetas. Osteoclasto.

ABSTRACT

Due to the scarcity of microscopic studies detailing aspects of bone remodeling in treated areas of Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ), the purpose of this study was to quantify the osteoclasts in two different forms of treatment for OMMBF: marginal bone resection with and without platelet rich plasma (PRP). Thirty rats were given intravenous administration of zoledronic acid in the caudal vein (4 doses). After 8 weeks, the right upper central incisor was extracted and its alveolar repair was followed. After the clinical verification of BRONJ, the surgical treatment was divided into two groups, containing 15 animals each: Group 1 (G1): submitted to alveolar curettage and marginal bone resection followed by insertion of PRP and Group 2 (G2): same procedure, but without PRP. After 14, 28 and 42 days, the animals were euthanized and the maxilla was dissected, fixed and included in paraffin blocks to prepare the slides that were submitted to the immunohistochemical procedures with the anti-TRAP marker, which was used to count the osteoclasts. No significant difference was found in the comparison between PRP and PRP groups, $p = 0.195$, nor significant difference in the comparison of times 14, 28, 42, $p = 0.089$, regardless of the group evaluated. Through this study, comparative forms of treatment (with and without PRP) did not influence the amount of osteoclasts.

Keywords: Osteonecrosis. Platelet rich plasma. Osteoclast.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	6
2	OBJETIVO	8
3	MATERIAL E MÉTODOS	9
4	RESULTADOS.....	13
5	DISCUSSÃO	14
6	CONCLUSÃO	17
	REFERÊNCIAS.....	18
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa em Animais.....	20
	ANEXO B – Relatório da estatística	21

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A osteonecrose medicamentosa dos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos (OMMBF) é uma complicação bucal importante, descrita inicialmente em 2003 (MARX *et al.*,2003) e que tem sido amplamente investigada, afim de estabelecer maior nível de evidência científica sobre sua patofisiologia, diagnóstico, tratamento e prognóstico. Estudos estimam uma incidência de 1% nos casos de OMMBF. A cada dia, novos trabalhos são publicados em periódicos de alto fator de impacto, no intuito de esclarecer informações que beneficiem os clínicos a lidarem com essa complicação bucal (RUGGIERO *et al.*,2014).

Os bisfosfonatos são medicamentos antirreabsortivos indicados no tratamento de distúrbios do cálcio, tanto para alterações ósseas benignas como malignas, dando ao paciente melhores condições de vida e ganho de massa óssea. O seu mecanismo de ação principal é a inibição da reabsorção óssea, através da interferência da atividade metabólica dos osteoclastos e na atividade anti-angiogênica. A combinação desses fatores resultam na inibição da reabsorção óssea reduzindo o nível de hipercalcemia provocada pelos tumores e/ou metástases ósseas (RUGGIERO *et al.*,2014).

Aliado ao mecanismo de ação dos bisfosfonatos, onde o principal efeito é na remodelação óssea, as principais hipóteses com relação à patofisiologia da OMMBF ainda são: supressão do turnover ósseo, inibição da angiogênese, fatores traumáticos locais, disfunções imunológicas, deficiências vitamínicas, toxicidade dos tecidos moles e presença de infecção (RUGGIERO *et al.*,2014; REID *et al.*,2007; WOOD *et al.*,2002).

Os aspectos terapêuticos são controversos na literatura, inexistindo um protocolo definido que apresente boa previsibilidade. Os primeiros trabalhos a discutir a forma cirúrgica de se abordar a OMMBF foi em 2006 (RUGGIERO *et al.*,2006) e, desde então, diversos outros trabalhos compartilham as experiências terapêuticas da OMMBF no intuito de elucidar qual a melhor forma de abordagem cirúrgica (LAM *et al.*, 2007; CURI *et al.*, 2007; MONT *et al.*, 1998; MARX *et al.*, 1998). O consenso atual, recomendado pela AAOMS (RUGGIERO *et al.*,2014), é de que as estratégias de tratamento sempre sejam abordadas de acordo com o estadio da OMMBF, considerando sempre o modo mais conservador inicialmente, e quando

necessário, a intervenção cirúrgica deve ser feita visando a melhora na qualidade de vida dos pacientes, como em casos de infecções e co-morbidades presentes (RUGGIERO *et al.*, 2014).

O tratamento através de ressecção óssea marginal combinada com fatores de crescimento têm apresentado resultados satisfatórios na resolução da OMMBF (LAM *et al.*, 2007; CURI *et al.*, 2007; MONT *et al.*, 1998; MARX *et al.*, 1998). O plasma rico em plaquetas (PRP) é uma fonte autóloga de fatores de crescimento, obtida através de um processo de centrifugação (ARORA *et al.*, 2009; LOPEZ *et al.*, 2010) que produz uma concentração muito elevada de plaquetas humanas contendo vários fatores de crescimento (fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento β -transformador, fator de crescimento epidérmico e fator de crescimento endotelial vascular), os quais promovem o início da cicatrização nas feridas (ARORA *et al.*, 2009; LOPEZ *et al.*, 2010).

Revisões sistemáticas recentes sobre o assunto, revelam uma deficiência importante em evidência científica sobre o tratamento da OMMBF, dificultando a conclusão sobre este tópico (ROLLASON *et al.*, 2016). Estudo recente revisou os tipos de abordagem cirúrgica para OMMBF, relatadas na literatura, e foi observado falta de detalhamento nos casos apresentados, o tempo de acompanhamento apresentou grande variabilidade, sendo representado desde curtos períodos (3 meses) e outros, um período maior (82 meses) (SILVA *et al.*, 2016).

Não foi encontrada muita evidência histomorfométrica do reparo, em áreas de OMMBF que foram tratadas com PRP. Dentro deste contexto, um único estudo experimental animal avaliando os efeitos da utilização do PRP no tratamento da OMMBF (SARKARAT *et al.*, 2014), revelou uma quantidade de osso vital existente foi maior no grupo que recebeu o PRP (SARKARAT *et al.*, 2014).

Diante da escassez de estudos microscópicos detalhando aspectos de remodelação óssea em áreas de OMMBF tratadas, considerando que os osteoclastos apresentam um papel significativo na etiopatogenia desta afecção, a proposta deste estudo foi quantificar os osteoclastos em duas diferentes formas de tratamento para OMMBF: ressecção óssea marginal com e sem PRP. A pergunta deste estudo é se o grupo tratado com PRP apresenta quantidade diferente de osteoclastos quando comparado ao grupo sem PRP.

2 OBJETIVOS

O objetivo central deste trabalho foi avaliar a presença de osteoclastos em alvéolos de ratos reparados após duas modalidades de tratamento da osteonecrose associada ao uso de bisfosfonatos (OMMBF): ressecção óssea marginal aliada ou não ao uso de plasma rico em plaquetas (PRP). Através desta análise, este estudo esclarecerá o seguinte questionamento:

1. Existe diferença na quantidade de osteoclastos, no reparo alveolar, após as duas diferentes formas de tratamento para a OMMBF?

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho apresenta aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (Protocolo CEUA/USC 12/14 - **Anexo A**) e recebeu um auxílio pesquisa da FAPESP (Processo 2014/10693-6) para a execução da parte experimental. Foram utilizados neste experimento, 30 ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar) machos, com peso aproximado de 180 a 220 gramas, mantidos no biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade do Sagrado Coração (USC). Os animais foram alimentados com ração sólida (Ração Ativada Produtor - Anderson & Clayton S.A.) e água a vontade. As caixas foram forradas com maravalha estéril e foram compartilhadas entre 3 animais. Os 30 demais animais foram divididos em 2 grupos (15 animais por grupo), com diferentes formas de tratamento, totalizando n=5 para cada período de análise (14, 28 e 42 dias).

▪ **Administração do ácido zoledrônico**

O modelo experimental de OMMBF (HOKUGO *et al.*, 2010), todos os animais receberam administração endovenosa de ácido zoledrônico (Zometa, Novartis, Basel, Switzerland, 35µg/kg em 0,9% NaCl,) na veia caudal. Foram realizadas um total de 4 administrações, num intervalo de 2 semanas entre cada aplicação, portanto, completando 8 semanas de administração.

▪ **Procedimento de exodontia**

O procedimento de exodontia foi realizado em todos os animais, após a administração total de ácido zoledrônico, seguindo a metodologia previamente descrita (CARDOSO *et al.*, 2011). Os animais foram submetidos à sedação com injeção intramuscular, a base de cloridrato de xilazina, na dose de 15mg/kg de peso e anestesiados com uma combinação de cloridrato de ketamina (25mg/kg) e xilazina (15mg/kg de peso) intramuscular. Após a antisepsia da área cirúrgica com solução aquosa de polivinilpirrolidona (PVPI tópico) (Gessy Lever Industrial Ltda.), o incisivo superior direito de cada animal foi extraído com a utilização de instrumentos adaptados para o procedimento. No pós-operatório imediato, foi administrado em dose única, Dipirona sódica 1mg/kg/dia, via intramuscular, para o controle de analgesia.

- **Diagnóstico da OMMBF**

O diagnóstico da OMMBF, inicialmente foi clínico, através da constatação de exposição óssea da região. Foram anotados os sinais de inflamação e infecção observados na região.

- **Tratamento da OMMBF**

A cirurgia de tratamento foi realizada 7 dias após a constatação clínica da OMMBF. Os 30 animais foram divididos em 2 grupos (15 animais cada grupo), com 2 formas diferentes de tratamento, totalizando n=5 para cada período de análise (14, 28 e 42 dias). O Grupo experimental (1): foi submetido a ressecção marginal da região de osso necrótico e/ou sequestrectomia, e curetagem alveolar seguida da colocação de PRP no leito ósseo viável. Para isso, os animais foram submetidos à sedação com injeção intramuscular a base de cloridrato de xilazina, na dose de 15mg/kg de peso e anestesiados com uma combinação de cloridrato de ketamina (25mg/kg) e xilazina (15mg/kg de peso) via intramuscular. O preparo do PRP foi feito seguindo o protocolo padronizado pela técnica de Anitua (ANITUA *et al.*, 2006). Após a anestesia do animal, 1,0ml de sangue foi obtido através de uma punção intracárdica, extraído com seringa de insulina e agulha gauge 25x7.

Foi adicionado 60 microlitros de citrato de sódio, à partir da proporção de citrato/sangue = 1:9. Os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 800 rpm (rotações por minuto), para separação das hemácias e obtenção do plasma. Removeu-se através de uma pipeta, o plasma com o mínimo de hemácias possível levando para 2ª. centrifugação por 10min a 1000 rpm para a melhor concentração das plaquetas. O sangue foi separado em seus três componentes básicos: glóbulos vermelhos na parte inferior do tubo (0,5 ml) e de plasma pobre em fatores crescimento na parte superior do tubo (0,3 ml). O plasma pobre em fatores crescimento foi eliminado por meio de pipetas, e 0,2 ml de plasma rico em plaquetas será obtido, para cada amostra, com um injetor estéril, sem dar qualquer dano. Este plasma será misturado com cloreto de cálcio a 10% (50 IL de PRP por 1mL de preparação) para ativá-lo, e será mantido em temperatura ambiente por 10 minutos, até adquirir um aspecto gelatinoso de fácil manuseio (WOOD *et al.*, 2002; RUGGIERO *et al.*, 2006; LAM; CURI, 2007). O gel de PRP foi preparado imediatamente antes de ser introduzido no leito cirúrgico, utilizando: 200 microlitros

do plasma à 140 microlitros de trombina com 140 microlitros de cloreto de cálcio 10%.

Após a antissepsia da área cirúrgica com solução aquosa de polivinilpirrolidona (PVPI tópico) (Gessy Lever Industrial Ltda.), a região afetada foi exposta através de descolamento da mucosa alveolar, curetagem do osso necrótico e em todos os animais, a ressecção se restringiu ao terço cervical alveolar do animal. Além disso, o alvéolo foi curetado previamente à inserção do PRP. Na sequência, foi inserido o PRP no interior do alvéolo e a mucosa alveolar foi suturada com vicryl 4.0, recobrando toda a região afetada. O outro grupo (2) foi submetido aos mesmos procedimentos descritos para o grupo experimental, com exceção da utilização do PRP.

Para ambos os grupos, no pós-operatório imediato, foi administrada uma dose intramuscular única de pentabiótico 0,1ml/kg para profilaxia de infecção local ou bacteremia. Para o controle de analgesia, foi administrada uma dose única de Buprenorfina 0,02-0,5mg/kg, via subcutânea e dipirona sódica 1mg/kg/dia por 3 dias, via intramuscular. Decorridos 14, 28 e 42 dias após o tratamento, 5 animais de cada grupo foram sacrificados por injeção de Tiopental 150mg/kg associada a 10mg de Lidocaína por via peritoneal. Após a ressecção dos maxilares, as peças foram fixadas em formalina a 10%.

Os procedimentos histotécnicos foram realizados no laboratório de histotécnica e imunohistoquímica da Universidade Sagrado Coração, com a participação da técnica bióloga Maira Couto. Após a fixação das peças, as mesmas foram desmineralizadas em solução de 4.13 EDTA (pH 7.2) à temperatura ambiente por aproximadamente 30 dias. A seguir, as peças foram processadas histologicamente e incluídas em parafina.

▪ **Procedimentos para análise imunoistoquímica**

Para a análise quantitativa das células osteoclastos, envolvidas na remodelação óssea, foi utilizada o marcador anti-TRAP. Desse modo, cortes de 3µm foram tratados com proteinase K por 30 minutos, a temperatura ambiente. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 2% por 10 minutos e lavados em PBS (Phosphate buffer solution). Após este período, foi utilizado anticorpo primário policlonal anti-TRAP (Santa Cruz Biotechnology), em temperatura ambiente por 24 horas, e lavados com PBS por 30 minutos, por três

vezes. Após, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário por 30 minutos, e em seguida, corados com o DAB (diaminobenzidina) (DAKO, Lab.) e contra-corados com Hematoxilina de Harris.

- **Análise dos resultados**

Para análise, foi obtida uma lâmina do alvéolo de cada animal. Cada terço alveolar foi submetido a captura (câmera: QIMAGING Micropublisher 3.3 Cooled, RTV) de 5 campos, em objetiva de 20X (microscópio óptico trinocular Nikon Eclipse 80i, Nikon Instruments INC) totalizando 15 imagens para cada amostra. As imagens foram submetidas a análise quantitativa pelo software Image-Pro® Plus version 5.1.2 for Windows XP, Media Cybernetics, INC, pertencente ao laboratório de biologia molecular e citogenética da USC com a orientação técnica do Wilson Orcini. Foi realizada a contagem de células TRAP positivas por um examinador. A análise foi de modo cego, sem saber qual grupo estava analisando.

- **Análise estatística**

A análise estatística foi realizada pelo Prof. Dr. Joel Ferreira Santiago Júnior. Os dados provenientes das mensurações foram organizados em tabela em formato Excel (Microsoft Office Excel, Redmond, WA, Estados Unidos) e submetidos ao software SigmaPlot (SigmaPlot, San Jose, CA, EUA) versão 13.0 e analisados em relação à distribuição normal (teste Shapiro-Wilk, $p=0,276$ e igualdade de variância, $p=0,507$) e, posteriormente, foi adotado o teste de Análise de variância a dois fatores (dois fatores de estudo: com e sem PRP, tempo: 14,28,42 dias) para execução das análises. Adotou-se um nível de significância de 5% para as análises.

4 RESULTADOS

Na tabela 1, se encontram todos os valores resultantes da contagem de osteoclastos por amostra, em cada período. Dois espécimes foram excluídos, pois apresentaram problemas no processamento histotécnico (do Grupo 2, 28(1) e 42(1) dias).

Tabela 1 - Valores de osteoclastos por espécime, de cada grupo, em cada período avaliado.

Grupo 1 (com PRP)	14 dias	28 dias	42 dias
Amostras	17,8	16,6	8,8
	13,8	5,8	17,4
	14,6	7,8	10,8
	5	10	8,8
	5,8	12,6	8
Grupo 2 (sem PRP)	14 dias	28 dias	42 dias
Amostras	17,4	8,8	6,4
	9	6	3
	8	13,8	1,2
	8,4	8,6	4,2
	21,2	————	————

Em uma análise considerando o fator grupo, não foi identificado uma diferença significativa na comparação dos grupos com PRP e sem PRP, $p=0,195$.

Em uma análise do fator tempo não foi identificado uma diferença significativa na comparação dos tempos 14,28,42, $p=0,089$, independentemente do grupo avaliado. Entretanto, observou-se que no grupo sem PRP (3,7), houve uma expressão 2,8 vezes menor quando comparado ao grupo com PRP (10,7) em 42 dias (Anexo B).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo pertence a linha de pesquisa do grupo que se iniciou em 2014 através do auxílio pesquisa concedido pela FAPESP (Processo 2014/10693-6). É importante ressaltar que os resultados demonstrados neste estudo estão sendo interpretados em conjunto com os outros resultados prévios que o projeto inicial proporcionou.

Considerando a metodologia desenvolvida, modelos animais ainda são considerados para esclarecer aspectos como etiopatogenia e tratamento, diante da limitação das pesquisas com seres humanos. Na seleção de um modelo animal, existem vários fatores a serem considerados para o desenvolvimento da osteonecrose, incluindo a representação das condições clínicas semelhantes a dos seres humanos.

Na literatura atual, autores utilizam a extração dentária como um fator desencadeador da osteonecrose, após a administração de bisfosfonatos, para a indução bem sucedida de seu aspecto clínico clássico: que é a presença de osso necrótico exposto ao meio bucal. A única limitação é com relação ao desconhecimento da dor, sintoma não mensurado com precisão em animais. A facilidade de manejo, alta capacidade reprodutiva e forte semelhança genética com os seres humanos, justifica a eleição dos roedores no modelo animal de desenvolvimento da osteonecrose na maioria dos estudos.

A administração dos bisfosfonatos em ratos, necessária para indução de OMMBF, é menor em comparação com seres humanos, permitindo a reprodução do experimento em curto prazo (KHAN *et al.*, 2015). No presente estudo, a administração do bisfosfonato foi baseada na metodologia previamente descrita por Hokugo em 2010, na qual simulou a indução de OMMBF estabelecendo um modelo animal possível de ser comparado aos seres humanos (HOKUGO *et al.*, 2010).

Embora a anatomia do incisivo central superior, de ratos Wistar, também pode ser considerada um desafio para um pesquisador iniciante, quando corretamente executada, possibilita o estudo do reparo alveolar e cristas ósseas adjacentes, envolvidas na doença, sem a presença de remanescentes radiculares, uma condição bastante comum após a exodontia dos molares de ratos. Além disso, deve ser considerado o fato deste grupo de dentes (incisivos superiores) ser modelo de estudo de reparo alveolar há mais de décadas (RODRIGUES *et al.*, 2011;

OKAMOTO *et al.*, 1973). Quando comparado aos molares superiores, consideramos uma maior facilidade de acesso para o procedimento de exodontia e a visualização das manifestações clínicas da afecção para um estudo como o presente. Vale ressaltar que quando a técnica não é bem executada, ocorre frequentemente a fratura dentária, pois a sua anatomia é bastante curva e, se a porção apical radicular com tecido germinativo permanecer no interior do alvéolo, o dente cresce continuamente, impossibilitando o estudo da região alveolar.

Considerando a análise dos resultados, ela foi realizada por um único examinador, após orientação e treinamento e sem o conhecimento do grupo e período avaliados. Os resultados deste estudo revelaram ausência de diferença significativa da quantidade de osteoclastos quando os grupos foram comparados.

Considerando os resultados de estudo prévios dentro do mesmo projeto, a histomorfometria no exame de microtomografia computadorizada, revelou neoformação óssea ligeiramente maior no grupo que recebeu o PRP. Através do exame de microtomografia computadorizada, somente as estruturas ósseas foram avaliadas, portanto o exame microscópico também foi executado afim de comparar minuciosamente o processo de reparo. A neoformação óssea foi evidenciada mais detalhadamente através da microscopia óptica, a qual revelou esse resultado de modo significativo quando comparado ao grupo sem PRP. Vale ressaltar que esses resultados significativos foram com 28 e 42 dias, períodos mais relevantes quando se avalia a neoformação óssea. Ainda, achados como: maior quantidade de vasos sanguíneos e imunomarcção mais presente para os anticorpos anti-VEGF, no grupo que recebeu o PRP, contribuíram para concluir que o PRP apresenta uma melhora na resolução da OMMBF, corroborando com a maioria dos estudos clínicos e experimentais neste contexto (CURI *et al.*, 2007, 2011; SARKARAT *et al.*, 2014; LONGO *et al.*, 2014; ADORNATO; LEE, 2007).

Apesar dos grupos avaliados no presente estudo não terem demonstrado diferença significativa, ao analisarmos a frequência dos valores, no grupo 1, que recebeu o PRP, houve uma frequência de valores maiores, quando comparado ao Grupo 2. Se a diferença fosse significativa, poderia ser sugerido que o PRP contribuiu para a melhora do processo de reparo considerando que os osteoclastos são células inibidas pelos bisfosfonatos, entretanto os resultados isolados deste estudo concluem que o PRP não interferiu na quantidade destas células. Analisando

a literatura, não foi encontrado nenhum trabalho similar para que se pudesse comparar a respeito.

6 CONCLUSÃO

Através deste estudo, pode ser observado que as formas de tratamento não influenciaram na quantidade de osteoclastos.

REFERÊNCIAS

- ADORNATO, M. C. et al. The treatment of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws with bone resection and autologous platelet-derived growth factors. **J Am Dent Assoc.** v. 138, p. 971, 2007.
- ANITUA, E. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. **Trends Biotechnol.** v. 24, n. 5, p. 227–34, 2006.
- ARORA, N. S. et al. Platelet-rich plasma: A literature review. **Implant Dent.** v. 18, p. 303, 2009.
- CARDOSO, C. L. et al. Experimental dry socket: microscopic and molecular evaluation of two treatment modalities. **Acta Cir Bras.** v. 26, n. 5, p. 365-72, 2011.
- CURI, M. M. et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws--an initial case series report of treatment combining partial bone resection and autologous platelet-rich plasma. **J Oral Maxillofac Surg.** v. 69, n. 9, p. 2465-72, 2011.
- CURI, M. M. et al. Treatment of avascular osteonecrosis of the mandible in cancer patients with a history of bisphosphonate therapy by combining bone resection and autologous platelet-rich plasma: Report of 3 cases. **J Oral Maxillofac Surg.** v. 65, n. 2, p. 349-55, 2007.
- HOKUGO, A. et al. Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with vitamin D deficiency in rats. **J Bone Miner Res.** v. 25, p. 1337, 2010.
- KHAN, A. A. et al. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. **J Bone Miner Res.** v. 30, n. 1, p. 3-23.3, 2015.
- LAM, D. K. et al. A review of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws and its management. **Can Dent Assoc.** v. 73, p. 417, 2007.
- LEE, C. Y. Use of platelet-rich plasma in the management of oral bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: A report of 2 cases. **J Oral Implantol.** v. 33, p. 371, 2007.
- LONGO, F. et al. Platelet rich plasma in the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: personal experience and review of the literature. **Int J Dent.** 2014.
- LOPEZ-VIDRIERO, E. et al. The use of platelet rich plasma in arthroscopy and sports medicine: Optimizing the healing environment. **J Arthrosc Surg.** v. 26, p. 269, 2010.
- MARX, R. E. et al. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 85, p. 638, 1998.
- MARX, R. E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: A growing epidemic. **J Oral Maxillofac Surg.** v. 61, p. 1115, 2003.
- MONT, M. A. et al. Osteonecrosis of the femoral head. Potential treatment with growth and differentiation factors. **Clin Orthop.** v. 355(suppl), p. 314, 1998.

- OKAMOTO, T. et al. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. **Rev Fac Odontol Araçatuba**. v. 2, p. 153-64, PMID: 4523734, 1973.
- REID, I. R. et al. Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? **Bone**. v. 41, p. 318, 2007.
- RODRIGUES, M. T. et al. Experimental alveolitis in rats: microbiological, acute phase response and histometric characterization of delayed alveolar healing. **J Appl Oral Sci**. v. 19, n. 3, p. 260-8, 2011.
- ROLLASON, V. et al. Interventions for treating bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). **Cochrane Database Syst Rev**. v. 26, p. 2, Feb 2016.
- RUGGIERO, S. L. et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. **J Oral Maxillofac Surg**. v. 72, n.10, p. 1938-56, Oct 2014.
- RUGGIERO, S. L. et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: Background and guidelines for diagnosis, staging and management. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. v. 102, p. 433, 2006.
- SARKARAT, F. et al. Platelet-Rich Plasma in treatment of zoledronic acid-induced bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. **Trauma Mon**. v. 9, n. 2, p.17196, 2014.
- SILVA, L. F. et al. Surgical management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: literature review. **Oral Maxillofac Surg**. v. 20, n. 1, p. 9-17, Mar 2016.
- WOOD, J. et al: Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 302, p. 1055, 2002.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Animais



PRPPG
Pró-Reitoria
de Pesquisa e
Pós-Graduação

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS CEUA - USC

CERTIFICADO

PROTOCOLO N° 12/14

A CEUA USC dentro de suas competências e seguindo normas vigentes no Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal – CONCEA analisou o projeto "Análise da utilização do plasma rico em plaquetas, no tratamento de osteonecrose maxilares associada ao uso de bifosfonatos", sob a responsabilidade da pesquisadora Prof.ª Dr.ª Camila Lopes Cardoso e o considerou APROVADO com a seguinte recomendação.

1- No item 10.6.1 que trata a respeito do jejum, foi assinalada a opção NÃO, porém logo abaixo está indicado duração de 12 horas. Solicita-se a remoção deste parágrafo do protocolo original a ser enviado ao biotério.

Bauru, 24 de junho de 2014.

Dra. Dulce H. J. Constantino
Presidente CEUA - USC

Francine Souza
Secretária CEUA - USC

ANEXO B - Relatório da estatística

Two Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

General Linear Model

Dependent Variable: Quantidade de OC

Normality Test (Shapiro-Wilk): Passed (P = 0,276)

Equal Variance Test (Brown-Forsythe): Passed (P = 0,507)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Grupos	1	36,836	36,836	1,783	0,195
Tempo	2	111,699	55,849	2,703	0,089
Grupos x Tempo	2	86,840	43,420	2,101	0,146
Residual	22	454,624	20,665		
Total	27	668,794	24,770		

The difference in the mean values among the different levels of Grupos is not great enough to exclude the possibility that the difference is just due to random sampling variability after allowing for the effects of differences in Tempo. There is not a statistically significant difference (P = 0,195).

The difference in the mean values among the different levels of Tempo is not great enough to exclude the possibility that the difference is just due to random sampling variability after allowing for the effects of differences in Grupos. There is not a statistically significant difference (P = 0,089).

The effect of different levels of Grupos does not depend on what level of Tempo is present. There is not a statistically significant interaction between Grupos and Tempo. (P = 0,146)

Power of performed test with alpha = 0,0500: for Grupos : 0,135

Power of performed test with alpha = 0,0500: for Tempo : 0,319

Power of performed test with alpha = 0,0500: for Grupos x Tempo : 0,218

Least square means for Grupos :

Group	Mean	SEM
Com PRP	10,907	1,174
Sem PRP	8,600	1,268

Least square means for Tempo :

Group	Mean	SEM
14 dias	12,100	1,438
28 dias	9,930	1,525
42 dias	7,230	1,525

Least square means for Grupos x Tempo :

Group	Mean	SEM
Com PRP x 14 dias	11,400	2,033
Com PRP x 28 dias	10,560	2,033
Com PRP x 42 dias	10,760	2,033
Sem PRP x 14 dias	12,800	2,033
Sem PRP x 28 dias	9,300	2,273
Sem PRP x 42 dias	3,700	2,273