



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

MARINA LINS MAYMONE DE MELO

**AVALIAÇÃO DO USO DO LASER Er:YAG NO TRATAMENTO
DA OSTEONECROSE MANDIBULAR INDUZIDA POR
BISFOSFONATOS: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.**

Recife – PE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA INTEGRADA

Marina Lins Maymone de Melo

**AVALIAÇÃO DO USO DO LASER Er:YAG NO TRATAMENTO
DA OSTEONECROSE MANDIBULAR INDUZIDA POR
BISFOSFONATOS: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.**

Dissertação apresentada ao Colegiado da Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada.

Orientador: Prof.Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros
Co-orientador: Prof. Dr. Danyel Elias Cruz Perez

Recife – PE

2014

**Ata da 151ª Defesa de Dissertação do curso de Mestrado em Odontologia com
Área de Concentração em Clínica Integrada do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 28 de agosto de 2014.**

Às 14(quatorze horas) do dia 28(vinte e oito) do mês de agosto do ano de 2014(dois mil e quatorze), reuniram-se no auditório da Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, os membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores: Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO, atuando como presidente, Prof. Dr. IGOR HENRIQUE MORAIS E SILVA , atuando como primeiro examinador, Prof. Dr. TIBERIO CESAR UCHOA MATHEUS, atuando como segundo examinador, para julgar o trabalho intitulado “**AVALIAÇÃO DO USO DO LASER Er:YAG NO TRATAMENTO DA OSTEONECROSE MANDIBULAR INDUZIDA POR BISFOSFONATOS: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**” da CD. MARINA LINS MAYMONE DE MELO, candidata ao Grau de Mestre em Odontologia, na área de Concentração em CLINICA INTEGRADA, sob orientação do Prof. Dr. LUIZ ALCINO MONTEIRO GUEIROS, e Co-orientação do Prof. Dr. DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ. Dando início aos trabalhos a Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, abriu os trabalhos convidando os senhores membros para compor a Banca Examinadora, foram entregues aos presentes cópias das Normas do Curso de Mestrado em Odontologia, que trata dos critérios de avaliação para julgamento da dissertação de Mestrado. A presidente da mesa após tomar posse conferiu os membros, seguindo convidou a candidata para expor sobre o aludido tema, tendo sido concedido trinta minutos. A candidata expôs o trabalho e em seguida colocou-se à disposição dos Examinadores para arguição. Após o término da arguição os examinadores reuniram-se em secreto para deliberações formais. Ao término da discussão, atribuíram a candidata os seguintes conceitos: Prof. Dr. IGOR HENRIQUE MORAIS E SILVA , (APROVADA), Prof. Dr. TIBERIO CESAR UCHOA MATHEUS, (APROVADA), Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO (APROVADA), a candidata recebeu três conceitos (APROVADA) é considerada (APROVADA), devendo acatar as sugestões da Banca Examinadora. Face a aprovação, fica a candidata apta a receber o Grau de Mestre em Odontologia desde que tenha cumprido as exigências estabelecidas de acordo com o Regimento Interno do Curso, cabendo a Universidade Federal de Pernambuco através de sua Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação, tomar as providências cabíveis. Nada mais havendo a tratar, a presidente da Banca examinadora encerrou a sessão e para constar foi lavrada a presente ata que vai por mim assinada, Oziclere Sena de Araujo e pelos demais componentes da Banca Examinadora e pela recém formada Mestre pela UFPE. MARINA LINS MAYMONE DE MELO .

Recife, 28 de agosto de 2014.

Prof.Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO
Presidente

Prof. Dr. IGOR HENRIQUE MORAIS E SILVA
1º Examinador

Orientador:

Prof. Dr. TIBÉRIO CESAR UCHOA MATHEUS
2º Examinador

Mestrando:

**Avaliação do uso do laser Er:YAG no tratamento de osteonecrose
mandibular induzida por bisfosfonatos: estudo experimental em ratos**

Marina Lins Maymone de Melo

Data da defesa: 28/08/2014

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA:

Prof. (a) Dr (a). Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho

Prof. (a) Dr. Igor Henrique Morais e Silva

Prof. (a) Dr. Tibério Cesar Uchoa Matheus

Recife – PE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR DA PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

COORDENADOR DA PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Profa. Dra. Alessandra Albuquerque T. Carvalho

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MESTRADO EM CLÍNICA INTEGRADA

COLEGIADO

MEMBROS PERMANENTES

Profa. Dra. Alessandra Albuquerque T. Carvalho

Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes

Prof.Dr. Arnaldo de França Caldas Junior

Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar

Prof.Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Profa.Dra. Flavia Maria de Moraes Ramos Perez

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

Profa. Dra. Liriane Baratella Evêncio

Prof.Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Prof.Dra. Maria Luiza dos Anjos Pontual

Prof.Dr. Paulo Sávio Angeiras Goes

Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira

Prof.Dra. Simone Guimaraes Farias Gomes

Prof.Dr. Tibério César Uchoa Matheus

MEMBROS COLABORADORES

Prof. Dr. Cláudio Heliomar Vicente da Silva

Profa. Dra. Lúcia Carneiro de Souza Beatrice

SECRETARIA

Oziclere Sena de Araújo

Dedico este trabalho a Deus por toda a inspiração, confiança, sabedoria, saúde e força que me deu até este momento;

À minha família, minha mãe Ana, meu pai Sérgio, meus irmãos Midian e Serginho, meu filho Miguel e meu marido Eduardo, que sempre acreditaram e torceram para que tudo desse certo. Obrigado por terem me ensinado o real valor da vida;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros, que acreditou em mim desde o início e me incentivou a buscar cada vez mais conhecimento, abrindo os meus olhos para a ciência, me servindo como fonte de inspiração para o saber.

AGRADECIMENTOS

Agradeço o apoio financeiro do REUNI-UFPE;

Aos professores, colegas e funcionários da Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco;

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia e a Universidade Federal de Pernambuco por me darem condições de chegar até aqui.

A minha família, que sempre torceu pelo meu sucesso;

Aos meus sogros e meu cunhado que cuidaram do meu filho durante minha ausência;

Aos meus amigos pelos momentos de apoio e descontração;

A minha amiga Dra. Samantha Cardoso pelo apoio, amizade e companheirismo;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Alcino, que mesmo sabendo das dificuldades que enfrentaria por minha condição de gestante, acreditou e investiu em mim;

Agradeço por toda a paciência e ensinamentos neste período;

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez, pelas orientações, pelas observações e por ter participado de forma direta deste projeto;

Ao pessoal do Núcleo de Cirurgia Experimental, em especial à Dra. Veridiana e Dr. Rodrigo, pois sem eles tudo seria bem mais difícil. Obrigado por toda a ajuda e momentos de descontração;

Ao Departamento de Energia Nuclear, em nome do Prof. Dr. Celso Dantas Antonino, Prof. Dr. Richard Heck, Cássia Bezerra Machado e Alexandra Carolina Gomes da Fonseca por viabilizarem as imagens com o microCT, além da amizade e confiança em meu trabalho;

As Profs. Dras. Flavia Maria de Moraes Ramos Perez e Maria Luiza dos Anjos Pontual por me ajudarem na questão da tomografia convencional e radiografia digital;

À equipe de Estomatologia da UFPE, Prof. Dr. Jair Carneiro Leão, Prof^a. Dra. Alessandra Carvalho, Prof. Dr. Igor Henrique Silva, Dra. Lucia Santos, Dra. Karine Azevedo, Rita Maria da Cruz e aos então monitores, agora Drs. Anivaldo Jr. e Teresa Gusmão, pela amizade, ajuda e companheirismo.

Ao grupo de professores do ETAO, Alisson Guedes, Lisandra de Paula e Paulo Augusto pela compreensão e amizade;

Aos colegas da turma de mestrado pelas conversas, aflições compartilhadas e muitas conversas animadas;

As funcionárias Oziclere e Tânia pela disposição em ajudar;

Resumo

O objetivo deste estudo foi comparar, em modelo animal, o tratamento da osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos (OMIB) realizado por cirurgia com laser Er:YAG com a cirurgia convencional. Foi realizado um estudo controlado experimental *in vivo*, utilizando 12 ratos Wistar machos, divididos em três grupos: controle (C), cirurgia convencional (CONV) e cirurgia a laser (LAS). Os animais foram tratados por 12 semanas com uma injeção intra-peritoneal semanal utilizando soro fisiológico na dosagem de 0,1ml/100g (grupo C) ou ácido zoledrônico (ZA) com doses de 0,15mg/Kg (grupos CONV e LAS). Os animais foram submetidos a exodontia de primeiro e segundo molares mandibulares para indução da OMIB, e então tratados com curetagem (grupo CONV) ou ablação a laser de Er:YAG (grupo LAS). Após a eutanásia, as mandíbulas foram removidas, fixadas em formol a 10% e analisadas através microtomografia computadorizada (microCT) para avaliação do padrão de trabeculado e densidade óssea. Os espécimes foram então processados e corados em HE para avaliação microscópica. A análise das imagens do microCT mostrou presença de sequestros ósseos, com aumento dos espaços medulares do osso esponjoso no grupo CONV. O trabeculado do grupo LAS apresentou padrão semelhante ao grupo C. A densidade óssea não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A análise microscópica evidenciou reparo ósseo alveolar avançado (acima de 60%) em todos os animais do grupo C e 75% do grupo LAS, sendo ausente em 50% do grupo CONV. O laser de Er:YAG apresenta-se como uma importante estratégia terapêutica para o tratamento cirúrgico da OMIB, sendo superior à curetagem.

Palavras-chaves: Bisfosfonatos, Lasers Er- YAG, OMIB

Lista de siglas e abreviaturas

OMIB – Osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos

ZA – Ácido zoledrônico

MicroCT – Microtomografia computadorizada

HE – Hematoxilina e eosina

BF – Bisfosfonato

TC – Tomografia computadorizada

AAOMS – Associação americana de cirurgia oral e maxilofacial

μ - Microns

ROI – Região de interesse

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

HU – Hounsfield

LLLT – Laserterapia de baixa potência

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| 1. Apresentação | p.10 |
| 2. Avaliação do uso do laser de Er:YAG no tratamento de osteonecrose mandibular induzida por bisfosfonatos: estudo experimental em ratos | p.10 |
| 2.1 Introdução | p.10 |
| 2.2 Metodologia | p.12 |
| 2.3 Resultados | p.18 |
| 2.4 Discussão | p.25 |
| Referências | p.30 |
| Anexo 1 - Parecer comitê de ética | p.34 |

1. Apresentação

Este documento é o relatório final de um estudo de dissertação sobre a atuação dos bisfosfonatos e o metabolismo ósseo, realizado em ratos. Teve por principal objetivo avaliar através de análises clínicas, imaginológicas e microscópicas o efeito dessa droga após exodontias em animais e seu tratamento, quando realizado por curetagem ou por laser Er:YAG.

2. Avaliação do uso do laser Er:YAG no tratamento de osteonecrose mandibular induzida por bisfosfonatos: Estudo experimental em ratos

2.1 Introdução

Os bisfosfonatos (BFs) foram sintetizados em 1865¹ e nas duas últimas décadas tem sido considerada a primeira classe de drogas prescrita para o tratamento de patologias ósseas associadas com sua excessiva reabsorção como osteoporose, doença de Paget e tumores ósseos malignos primários e secundários, como metástases ósseas provocadas por mieloma múltiplo, câncer de mama, pulmão e próstata²⁻⁴

Apesar do uso intravenoso de bifosfonatos ter sido introduzido e amplamente utilizado desde o ano de 1995⁵, somente em 2003 foi reportada a descrição clínica de 9 pacientes que evoluíram com extensa osteonecrose dos maxilares⁶, potencialmente associada ao tratamento medicamentoso. A OMIB é a primeira complicação provocada com o uso a longo prazo dessa medicação⁷.

Atualmente a OMIB pode ser definida como “aparecimento inesperado de osso necrótico na cavidade oral, persistente por mais de oito semanas, em

pacientes que fizeram ou fazem uso de agentes anti-reabsortivos ou antiangiogênicos, sem história de radioterapia no complexo maxilomandibular e sem doença metastásica nessa região.”⁸ O quadro pode evoluir de modo doloroso ou assintomático, e eventualmente envolver extensas porções dos ossos gnáticos^{8,9}. Seus principais fatores de risco incluem tipo de droga, via de administração, tempo de tratamento e a realização de procedimentos cirúrgicos dento-alveolares⁸⁻¹⁰.

As lesões normalmente são confirmadas por radiografias, e mostram áreas radiopacas, circundadas por áreas radiolúcidas, sugestivas de sequestros ósseos¹⁰. Porém as lesões iniciais podem não ser detectadas por esse método¹¹.

Quando se trata de OMIB estabelecida, uma área osteolítica mal definida é vista juntamente com destruição da cortical óssea, perda de trabeculado esponjoso, e uma diminuição da densidade óssea (similar aos achados radiológicos de osteomielite). Osteonecrose precoce, restrita a pequenas áreas de exposição óssea (<1 cm), pode ser indetectável em radiografias panorâmicas convencionais. Nesse estágio, apenas a tomografia computadorizada (TC) pode indicar a presença da lesão^{10,12,13}. Estudo recente, mostra que a OMIB só deve ser estadiada com o uso de TC, uma vez que esse exame é mais preciso, principalmente para casos iniciais. Ainda é relatado que não existe concordância entre o estadiamento clínico proposto pela AAOMS (American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons) e os achados tomográficos, sendo este último método mais confiável^{8,14}.

Na TC, áreas suspeitas ou que já apresentem a OMIB são detectadas como áreas osteolíticas ou com alterações de osteoesclerose comparadas ao

osso sadio circundante, e a região pode apresentar alterações no trabeculado ósseo^{12,13}. Os sinais de destruição do osso esponjoso e erosão nas corticais ósseas são os dois achados mais frequentes e mais típicos da patologia¹⁵.

O tratamento da OMIB ainda é um desafio aos profissionais envolvidos no seu manejo, e diversos protocolos terapêuticos vêm sendo descritos na literatura com índices variáveis de sucesso. Seu tratamento inclui medidas locais, suporte sistêmico e abordagem cirúrgica¹⁶.

Recentemente tem se apontado a ressecção cirúrgica como a opção terapêutica com desfecho clínico mais previsível, e neste espectro a exérese com laser cirúrgico tem apresentado resultados encorajadores²⁰⁻²³. Contudo, uma melhor compreensão da evolução dos pacientes tratados cirurgicamente se faz necessária. Para o reparo de perdas de tecido em doença progressiva, reconstruções ósseas e teciduais são indicadas¹⁷⁻¹⁹.

O sucesso no uso do laser cirúrgico de Er:YAG foi relatado no tratamento da OMIB, quando associado à laserterapia²³. Seu maior benefício é o de possuir um alto potencial bioestimulador e a ablação dos tecidos. Sendo assim, esse laser foi descrito recentemente como o mais promissor para cirurgias ósseas^{21,22}. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi comparar o tratamento da OMIB realizado de modo convencional e com laser de Er:YAG.

2.2 Metodologia

Desenho do estudo e Considerações Éticas

Este estudo é do tipo controlado experimental *in vivo*. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE nº23076.016751/2013-92) (Anexo 1).

Animais

Foram utilizados 12 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), machos, adultos, pesando entre 300 e 400 gramas. Os animais foram obtidos e mantidos em experimentação no Núcleo de Cirurgia Experimental da Universidade Federal de Pernambuco.

Os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos contendo quatro animais cada, sendo 2 grupos experimentais e 1 controle. Todos os animais foram submetidos à injeção semanal, via intraperitoneal, da medicação da seguinte maneira: Os animais dos grupos experimentais foram tratados com zolendronato (ZA) (ZOMETA, Novartis Farmacêutica, Basel, Suíça) com a dosagem de 0,15 mg/Kg/semana, enquanto o grupo controle foi tratado com injeção de 0,1mL/100g de solução salina,todos por 12 semanas, de acordo com a figura 1.

Procedimentos cirúrgicos

Foram realizadas 2 etapas cirúrgicas (indução e tratamento da OMIB – para os grupos CONV e LAS). O grupo C só foi submetido à primeira etapa cirúrgica. Antes de cada procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina 1 mL/Kg associado a xilazina 0,5 mL/Kg, por via intramuscular. Na indução da OMIB (semana 8), os mesmos foram submetidos à exodontia dos primeiros e segundos molares inferiores

esquerdos. Foi então realizada uma canaleta, estendendo-se da mesial do terceiro molar à mesial da região do primeiro molar, com auxílio de peça reta (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, São Paulo) acoplada ao motor cirúrgico (Smart®, Driller, São Paulo, Brasil) e broca 701, com finalidade de aumentar o trauma cirúrgico. Por fim, os alvéolos foram suturados com fios 4-0 Vicryl (Ethicon - São Paulo - Brasil).

Na (segunda etapa cirúrgica (semana 12) foi realizado o tratamento da OMIB. Os animais foram novamente anestesiados, seguindo o mesmo protocolo usado anteriormente, e foi realizada avaliação clínica da ferida cirúrgica por meio de fotografias tomadas anteriormente ao procedimento cirúrgico. O grupo CONV foi tratado por curetagem de área de osteonecrose, sendo o osso necrótico removido por meio de curetas de dentina nº2 (Golgran – São Paulo - Brasil) até obter-se sangramento do osso residual. O grupo LAS foi tratado com ablação da área de osteonecrose com laser Er:YAG (2,940nm) (300mJ, 30Hz, 60J/cm²) (Fidelis Plus® III. Fotona, Ljubljana, Eslovênia), até obtenção de sangramento do osso residual. As lojas cirúrgicas foram suturadas de modo semelhante ao citado anteriormente.

Na semana 16, os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica com cloridrato de cetamina e as mandíbulas foram removidas, dissecadas, desarticuladas e acondicionadas em frascos plásticos contendo solução de formol a 10%. A hemi-mandíbula direita foi desprezada.

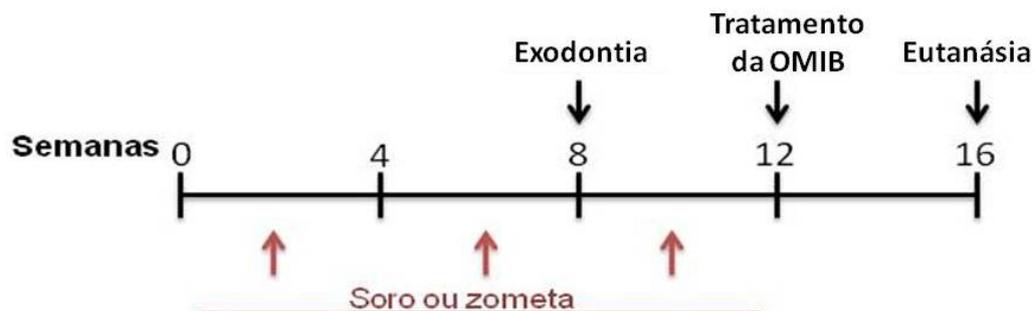


Figura 1. Representação esquemática do protocolo de pesquisa.

Avaliação Clínica

A avaliação clínica das áreas operadas foi realizada por meio de fotografias realizadas em 2 momentos. A primeira análise foi realizada na semana 12, anteriormente ao tratamento da OMIB. A segunda análise foi realizada logo após a dissecação das mandíbulas, com a peça cirúrgica em mãos. Foram avaliadas a presença de recobrimento epitelial da ferida cirúrgica

Microtomografia computadorizada (microCT)

Os espécimes foram submetidos ao microCT utilizando o tomógrafo de terceira geração Nikon XT H 225, operando a 80 kV e 222 μ A, sem filtro, utilizando protocolo com tamanho de voxel de 12 microns (μ) e tempo de exposição de 25 minutos. Posteriormente, as imagens foram reconstruídas e avaliadas utilizando-se o software CTPro (Nikon). As imagens foram analisadas nas reconstruções multiplanares (axial, sagital e coronal), através do software VGStudioMax 2.2. Para avaliação de padrão de trabeculado ósseo e cálculo de densidade foi utilizado o software ImageJ. Todas as imagens (ImageStack) foram transformadas em 32 bit (para avaliação da densidade), diminuídas em seu valor em 1000 HU (visando a transformação da escala para área médica).

Nos cortes sagitais foram avaliadas a densidade de ROIs (regiões de interesse) de 40X80 pixels de área, posicionados logo abaixo da parede apical ao longo do defeito ósseo (figura 2). Para a análise foi determinada a extensão do defeito ósseo, e esta foi dividida por 5, de modo a obter 6 ROIs distribuídas uniformemente (figura 3). Os padrões foram estabelecidos fazendo testes nos softwares para verificação do que se enquadrasse melhor a este estudo.



Figura 2: Delimitação das ROIs logo abaixo das paredes apicais do defeito ósseo – corte sagital.

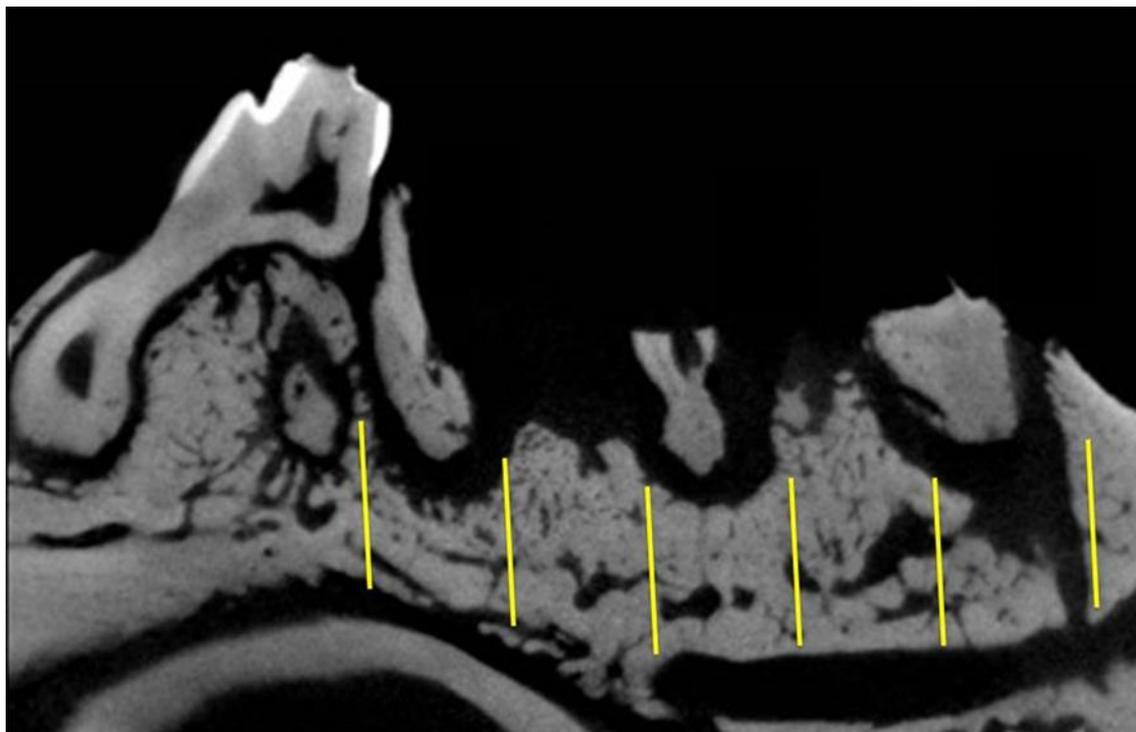


Figura 3 : Distribuição das ROIs de maneira uniforme durante o defeito (linhas amarelas) - corte coronal.

Foram gerados histogramas para cálculo de densidade em escala Hounsfield. As alterações de padrão de trabeculado ósseo medular foram observadas em região abaixo do defeito cirúrgico.

Análise microscópica

Os espécimes foram descalcificados em ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) a 5% e seccionados em cortes sagitais, para posterior análise da área operada incluindo as corticais ósseas vestibulares e linguais. Em seguida, foram submetidos a processamento histológico convencional e incluídos em parafina. Cortes histológicos de 5 μ m de espessura foram corados em hematoxilina e eosina. Os critérios analisados foram presença e tipo de

infiltrado inflamatório (ausente, leve, moderado e intenso), presença de necrose, sequestro ósseo, colônias bacterianas, abscesso/microabscesso, além da integridade epitelial e grau de reparo de tecido ósseo (grau I – sem reparo, grau II – reparo inicial – preenchimento de 1-30% do alvéolo, grau III – reparo moderado – preenchimento de 31 a 60% do alvéolo, e grau IV – reparo avançado – preenchimento de mais de 61% do alvéolo), adaptando o protocolo de Ali_Erdem et al¹⁷.

Análise estatística

Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para cálculo de densidade, em um intervalo de confiança de 95%.

2.3 Resultados

Avaliação clínica

Avaliação 1 (semana 12)

Todos os animais (4/100%) do grupo controle apresentaram completo fechamento da ferida cirúrgica. Todos os animais tratados com zometa (CONV e LAS) apresentaram presença de tecido ósseo necrótico em toda extensão da ferida cirúrgica (Figura 3).

Avaliação 2 (semana 16)

Todos os animais (4/100%) do grupo C apresentaram recobrimento da ferida cirúrgica com preservação das corticais ósseas. Todos os animais do grupo CONV (4/100%) apresentaram exposição óssea com ausência de reparo

do tecido mole. No grupo LAS, 3 animais (75%) apresentaram recobrimento mucoso parcial da ferida cirúrgica com pequenas áreas de exposição óssea (Figura 4).

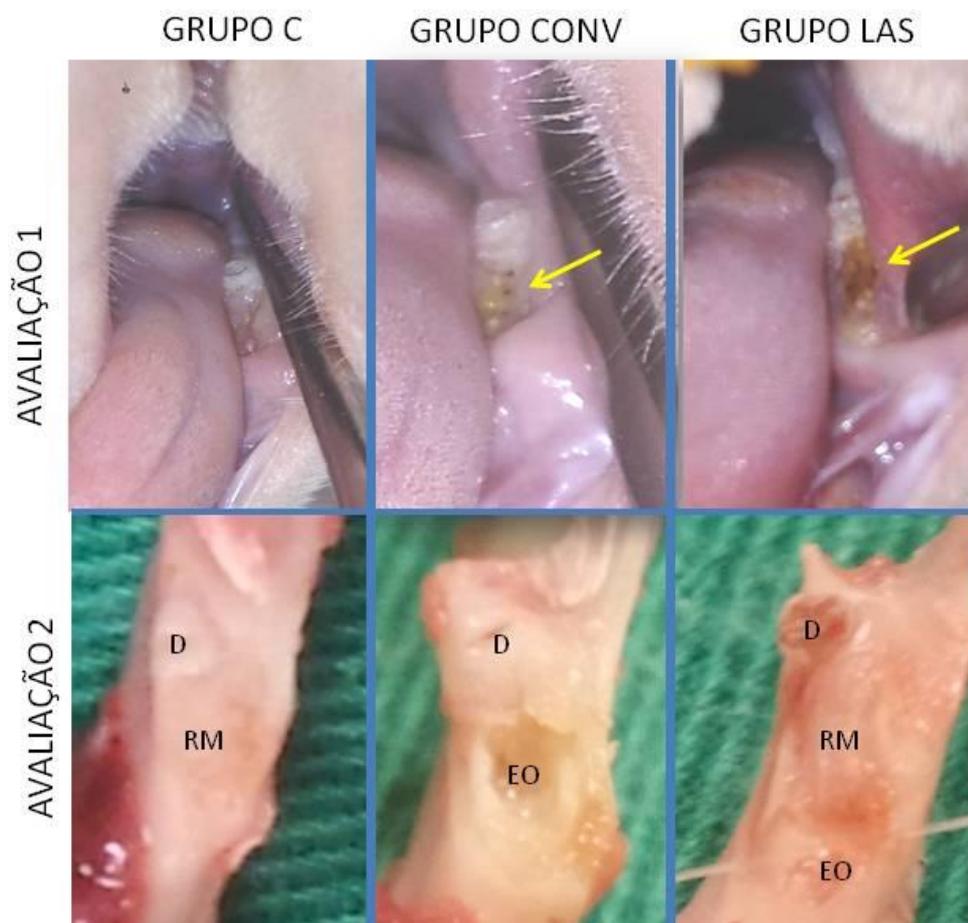


Figura 3: Imagens representativas das avaliações clínicas. No grupo C é possível verificar o completo recobrimento mucoso (RM) na avaliação 1 e 2. O grupos CONV e LAS apresentaram presença de tecido ósseo necrótico (seta amarela) durante a avaliação 1. Na avaliação 2, é possível visualizar recobrimento mucoso parcial no grupo LAS, com pequena área de exposição óssea (EO) e exposição óssea em toda a extensão do alvéolo no grupo CONV.

MicroCt

Trabeculado osseo

O grupo C mostrou um trabeculado uniforme, compacto, com poucos espaços medulares (4/100%), com sequestro ósseo em apenas um animal (25%). O grupo CONV apresentou um trabeculado irregular, com extensão da necrose em profundidade, aumento dos espaços medulares e presença de sequestros ósseos em todos os animais. O grupo LAS apresentou trabeculado compacto, com poucos espaços medulares e presença de sequestros ósseos (3/75%) (Figura 5).

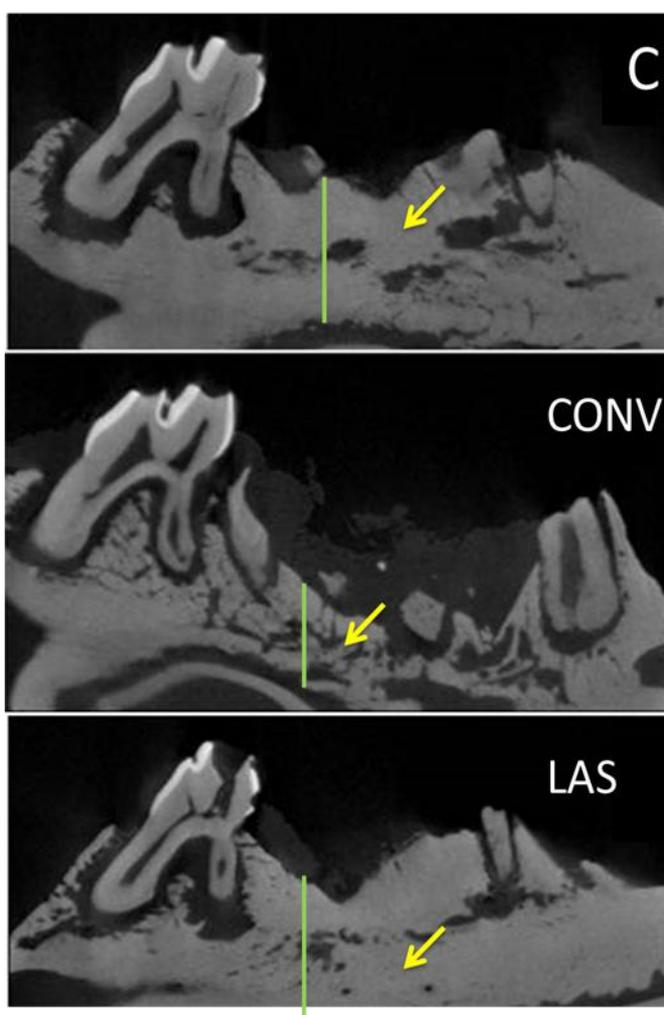


Figura 5: Comparação do padrão de trabeculado ósseo entre o grupo controle, grupo CONV e grupo LAS. É possível visualizar alteração no trabeculado esponjoso (setas amarelas) entre os grupos e a extensão da destruição óssea em sentido apical (linhas verdes) – corte coronal - espessura 12 μ m.

Reconstrução tridimensional

Foi possível verificar a presença de sequestros ósseos em todos os grupos, embora no grupo controle tenha sido em menor quantidade (Figura 6).

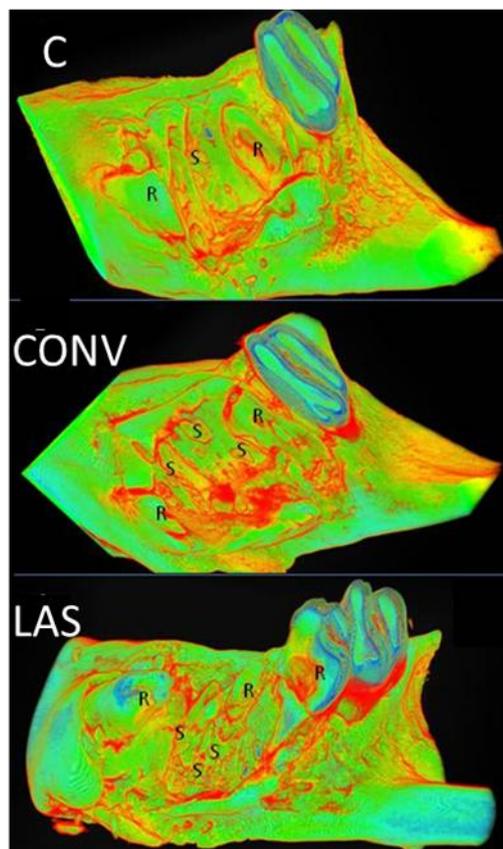


Figura 6. Reconstrução 3D dos espécimes, expondo presença de sequestros ósseos (S).

Avaliação de densidade óssea

A densidade ossea variou de modo discreto entre os grupos, sendo maior no grupo LAS ($p=0,3235$). O desvio padrão no grupo CONV foi consideravelmente mais elevado que nos demais (Tabela 1).

Tabela 1: Avaliação da densidade em escala Hounsfield.

| | Densidade média (em HU) | dp | p valor |
|---------------|----------------------------|-----------|---------|
| GC | 4.301,022 | 979,605 | 0,3235 |
| G CONV | 4.273,455 | 1.638,628 | |
| G LAS | 4.422,753 | 877,151 | |

Avaliação microscópica

Nos animais do grupo C não houve inflamação no tecido de granulação residual em 50% dos espécimes e a outra metade apresentou reação inflamatória leve (Figura 7). O grupo CONV apresentou reação inflamatória que variou de moderada a intensa, com presença predominante de linfócitos e com áreas e microabscessos (Figura 8). Nos animais do grupo LAS, a intensidade da inflamação variou de leve a moderada, formada predominantemente por linfócitos, embora na metade dos espécimes neutrófilos também tenham sido encontrados (Figura 9).

Os espécimes do grupo CONV apresentaram necrose da cortical óssea circundante ao local das exodontias, além de necrose do tecido ósseo neoformado e sequestros ósseos em todos os animais (Figura 8). Por outro lado, necrose do tecido ósseo neoformado foi observada em metade dos animais do grupo LAS (Figura 9). Não foi observada necrose do tecido ósseo neoformado nos animais do grupo controle. A presença de colônias bacterianas também foi um achado observado em 75% das amostras do grupo CONV e em apenas 1 animal tratado com laser de ER:YAG.

Com relação à quantidade de osso formado no reparo alveolar, o grupo C apresentou neoformação óssea avançada preenchendo praticamente todo o alvéolo (Figura 7). No grupo tratado com cirurgia convencional, metade dos animais mostrou menos de 3% da área operada preenchida por osso neoformado, enquanto nos outros 2 animais entre 30% e 60% do alvéolo estava reparado (Figura 8). Já o grupo LAS, a quantidade de tecido ósseo neoformado foi comparada àquela observada nos animais do grupo C (Figura 9).

Tecido epitelial recobrindo a área operada foi observado nos animais do grupo controle, enquanto metade dos animais do grupo CONV não apresentava epitélio recobrindo totalmente o alvéolo. Os animais do grupo LAS apresentaram padrão de epitélio semelhante àquela observado no grupo controle.

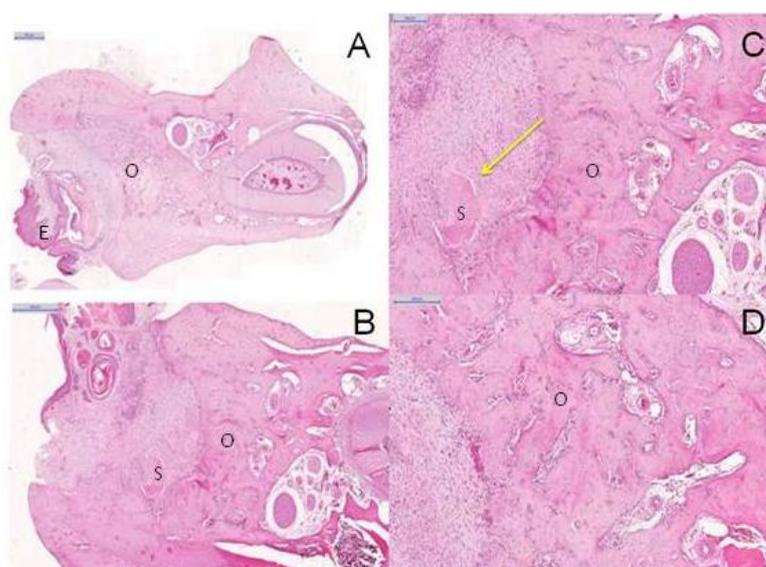


Figura 7: Cortes histológicos do Grupo C mostrando reparo ósseo intra-alveolar (O) em estágio avançado, recobrimento parcial do epitélio (E) e sequestros ósseos (S).

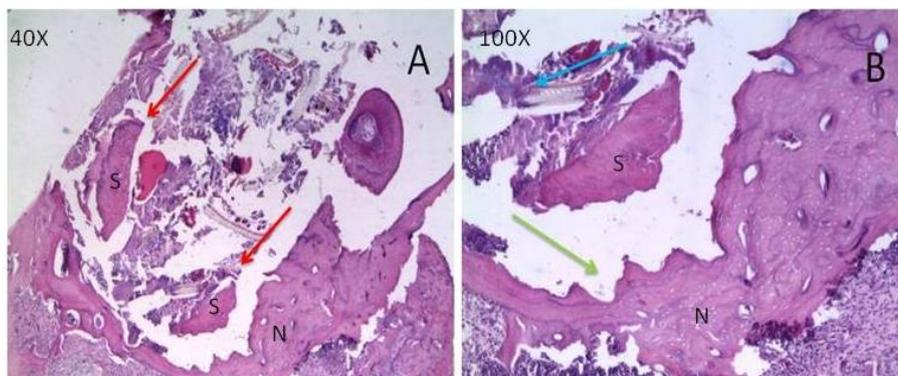


Figura 8: Cortes histológicos do Grupo CONV onde não existe reparo ósseo intra-alveolar. É possível a visualização de infiltrado inflamatório intenso, microabscessos, áreas de sequestro ósseo (S - seta vermelha), tecido ósseo alveolar necrosado (N - seta verde) e colônias bacterianas (seta azul).

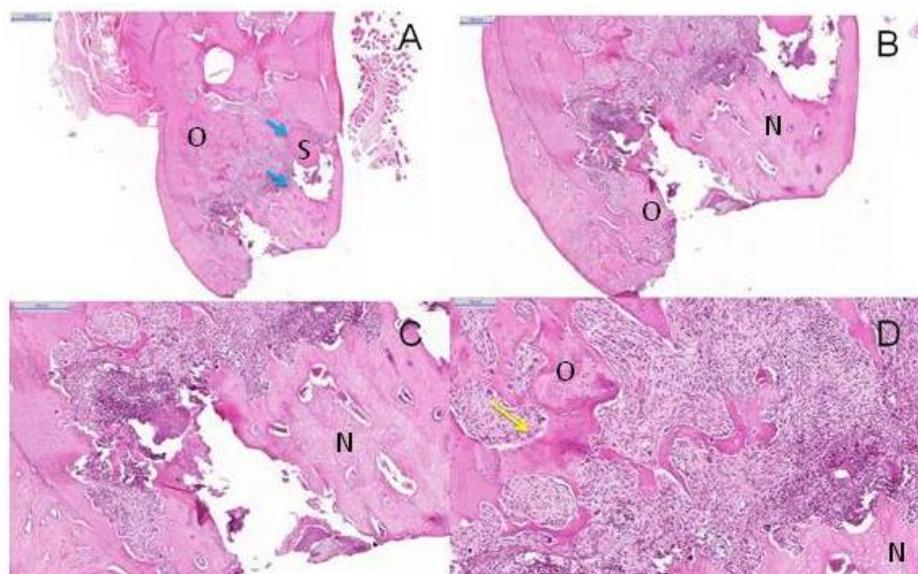


Figura 9: Cortes histológicos do Grupo LAS. Imagens mostram reparo ósseo intra-alveolar moderado (O), com tecido vital neoformado (O - seta amarela), necrose da parede ósseo alveolar (N) e sequestros ósseos (S).

2.4 Discussão

O tratamento da OMIB ainda é um tema controverso, e a abordagem cirúrgica nem sempre apresenta resultados favoráveis. Neste contexto, a ablação com laser de Er:YAG tem sido sugerida como uma interessante alternativa de tratamento, que apresenta resultados clínicos mais previsíveis e seguros²³. Contudo, a avaliação da resposta óssea a estes tratamentos ainda carece de maior compreensão. Neste sentido, este estudo teve por objetivo analisar, em modelo animal, a resposta ao tratamento cirúrgico da OMIB realizado de modo convencional e com laser de Er:YAG. Foi observado que tratamento com laser Er:YAG promoveu melhor reparo ósseo e maior recobrimento de tecido mole, com diminuição do infiltrado inflamatório e discreto aumento da densidade óssea da área tratada. Notou-se que os animais tratados com curetagem evoluíram com permanência e extensão da necrose, com manutenção de um infiltrado inflamatório intenso, ausência de reparo ósseo e discreta diminuição da densidade óssea.

Dois estudos^{24,25} sobre a cicatrização de alvéolos de extração em ratos normais mostram que a neoformação óssea em alvéolos pós-exodontia começa cerca de 2 dias após a extração, e torna-se preenchido após 14 dias. No presente estudo, 30 dias após a exodontia, o GC apresentou excelente grau de reparo ósseo, bem como o grupo tratado com laser Er:YAG (mais de 60% do alvéolo preenchido).

Ali-Erdem et al¹⁷, em 2011, realizaram um estudo com animais, comparando o grau de reparo em animais tratados com zometa e dexametasona. Os animais foram eutanasiados 28 dias após a exodontia dos molares mandibulares. Eles observaram uma completa epitelação nos sítios da exodontia apenas no grupo controle. Neste estudo, o grau de epitelação do grupo controle e no grupo tratados com laser também foi considerado avançado, onde mais de 60% do alvéolo foi preenchido com osso neoformado.

As características do infiltrado inflamatório também foram diferentes entre os grupos. No grupo controle, o infiltrado inflamatório de mostrou ausente em 50% das amostras e leve nos outros 50%. Variou de leve a moderado no grupo tratado com laser e de moderado a intenso no grupo tratado com curetagem convencional. O estudo realizado por Ali-Erdem et al¹⁷ também mostra presença de infiltrado inflamatório moderado em animais tratados com zometa associado a dexametasona.

Com relação ao padrão de trabeculado ósseo, alguns estudos falam que existe uma alteração dessa estrutura em pacientes e animais que fazem uso de BFs^{26,27}. Neste estudo foi possível observar uma alteração do padrão de trabeculado, onde o grupo CONV mostrou um trabeculado com grandes espaços medulares. Na análise do densidade (tabela 1), é possível verificar uma densidade menor que os outros grupos, bem como um alto desvio padrão (sugestivo de maiores transições entre tons de cinza pela escala HU). O grupo LAS apresentou resultados superiores que o grupo controle, onde a densidade foi ligeiramente maior e o desvio padrão menos (representando um osso mais compacto).

Surpreendentemente, seqüestros ósseos foram vistos também no grupo de controle, sob o epitélio sobrejacente intacto tanto no estudo de Abtahi et al²⁷, como no nosso. Isto sugere que o seqüestro de osso morto ou infectado é parte importante do processo de cicatrização.

Não existem estudos suficientes descrevendo as características ósseas e de reparo através do microCT para avaliação da OMIB. Na tomografia computadorizada vários autores concordam que existe uma alteração no padrão de trabeculado ósseo (perda de trabeculado esponjoso), diminuição da densidade óssea e, em alguns casos, presença de sequestro ósseo em pacientes que fazem uso de bisfosfonatos^{13,15,28}.

Embora o tratamento da OMIB já tenha sido bem estabelecido pela AAOMS em 2009⁹, e ratificado em 2014⁸, não existe protocolo para o uso do laser. Um estudo realizado por Vescovi et al²³, em 2010, foi bastante promissor para essa forma de tratamento. Os autores dividiram 4 grupos de estudo, onde o G1 foi tratado com amoxicilina associada a metronidazol por duas semanas (via oral), o G2 recebeu terapia com laser de baixa potência Nd:YAG (LLLT), o G3 foi tratado com cirurgia convencional (debridamento/ressecção) e o G4 foi submetido a cirurgia com laser Er:YAG associado a laserterapia (LLLT). Todos os sítios tratados com laser de Er:YAG tiveram uma melhora clínica de 100%. O resultado obtido no G4, é extremamente significativo em comparação com os obtidos por tratamento medicamentoso ou em uma abordagem cirúrgica tradicional. Graças ao elevado grau de afinidade deste comprimento de onda para a água e hidroxiapatita, ambos os tecidos (mole e duro) podem ser facilmente tratados. Esta técnica também pode ser usada para operações conservadoras onde o osso necrosado é vaporizado. Além disso, uma

vantagem adicional é de que o laser Er: YAG é bactericida e potencialmente bioestimulador, acelerando a cicatrização, em comparação com os tratamentos convencionais. Os autores concluíram que uma abordagem cirúrgica conservadora precoce com laser Er: YAG associado com LLLT, para OMIB pode ser considerado como mais eficiente em comparação com a terapia médica ou outras técnicas convencionais.

Os achados clínicos são compatíveis com os encontrados na microscopia e microCT. O grupo C apresentou um bom padrão de reparo, assim como o grupo LAS. O grupo CONV apresentou os resultados clínicos, microscópicos e de imagem menos favoráveis (Tabela 2).

Tabela 2: Principais achados microscópicos.

| PRINCIPAIS ACHADOS | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|------------------------|------------------|---------------------|--------------|------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--|---|-----------------|
| | CLÍNICOS | | | | MICROSCÓPICOS | | | | MICROCT | | | |
| | RECOBRIMENTO EPITELIAL | PRESENÇA DE OMIB | RECOBRIMENTO MUCOSO | REPARO ÓSSEO | REPARO EPITELIAL | REQUETRO ÓSSEO | SEQUESTRO ÓSSEO | SEQUESTRO ÓSSEO | SEQUESTRO ÓSSEO | PRESERVAÇÃO DE CORTICAL VESTIBULAR E LINGUAL | PADRÃO DE TRABECULADO DO OSSO ESPONJOSO | DENSIDADE MÉDIA |
| GC | Total | Não | Total | Avançado | Avançado | Sim | Sim | Sim | Sim | Normal | 4.301,022 | Sim |
| GCONV | Não | Sim | Não | Inicial | Inicial | Sim | Sim | Sim | Não | Alterado | 4.273,455 | Sim |
| GLAS | Parcial | Sim | Parcial | Moderado | Moderado | Sim | Sim | Sim | Não | Normal | 4.422,753 | Sim |

Este modelo de estudos em animais mostrou-se efetivo, uma vez que foi possível estabelecer um protocolo de indução da osteonecrose com ácido

zoledrônico, bem como avaliar duas formas de tratamento. Diversos estudos com animais mostram a efetividade deste modelo²⁴⁻²⁵.

Conclui-se que o grupo tratado com laser Er:YAG obteve um melhor padrão de reparo quando comparado ao grupo submetido a cirurgia convencional. Estes achados confirmam os melhores resultados clínicos associados ao tratamento com laser de Er:YAG. Neste estágio faz-se necessário a realização de estudos clínicos randomizados comparando a ablação com laser com os métodos tradicionais, de modo a definir o padrão de tratamento mais adequado para este quadro clínico.

REFERÊNCIAS

1. Fleisch H. Bisphosphonates: Mechanisms of action. *Endocrine Reviews* 1998; 19(1):80–100.
2. Francis MR. Oral bisphosphonates in the treatment of Osteoporosis: a review. *Curr Ther Res* 1995; 56:831-51.
3. Drake MT, Clarke BL, Khosla S . Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc* 2008; 83:1032-45.
4. Little DG, McDonald M, Sharpe IT, Williams P, McEvoy T. Zoledronic acid improves femoral head sphericity in a rat model of perthes disease. *J Orthop Res* 2005; 23:862–68.
5. Michaelson MD, Smith MR. Bisphosphonates for treatment and prevention of bone metastases. *J Clin Oncol* 2005; 23:8219–24.
6. Russell RG, Rogers MJ. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone* 1999; 25:97–106.

7. Migliorati CA, Schubert MM, Peterson DE, Seneda LM. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of mandibular and maxillary bone: an emerging oral complication of supportive care in cancer. *Cancer* 2005; 104:83–93.
8. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 2014.
9. Ruggiero SL, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws—2009 Update. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67:2-12, Suppl 1.
10. Borgioli A, et al. Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw: Clinical and physiopathological considerations. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2009;5: 217–27.
11. Sigua-Rodriguez EA, Ribeiro RC, Brito ACR, Alvarez-Pinzon N, Albergaria-Barbosa JR. Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw: A Review of the Literature. *International Journal of Dentistry*. 2014; Volume 2014, Article ID 192320, DOI 10.1155.
12. Yamazaki T, Takahashi K, Bessho K. Recent Clinical Evidence in Bisphosphonate-related Osteomyelitis of the Jaw: Focus on Risk, Prevention and Treatment. *Reviews Recent Clinical Trials* 2014; 9:37-52.
13. Farias DS, et al. Clinical and Image Findings in Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws. *J Craniofac Surg* 2013; 24:1248-51.
14. Alberto B, et al. Staging of osteonecrosis of the jaw requires computed tomography for accurate definition of the extent of bony disease. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2014; 52:603-8.

15. Wilde F, et al. Prevalence of cone beam computed tomography imaging findings according to the clinical stage of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Oral and Maxillofacial radiology* 2012; 114(6):804-11.
16. Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL: Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62(5):527-34.
17. Ali - Erdem M, Burak - Cankaya A, Cemil - Isler S, Demircan S, Soluk M, Kasapoglu C, Korhan - Oral C. Extraction socket healing in rats treated with bisphosphonate: animal model for bisphosphonate related osteonecrosis of jaws in multiple myeloma patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011; 16:879–83.
18. Pautke C, Kreutzer K, Weitz J, Knodler M, Munzel D, Wexel G, Otto S, Hapfelmeier A, Sturzenbaum S, Tischer T. Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw: a minipig large animal model. *Bone* 2012; 51:592–9.
19. Mehrotra B, Ruggiero S. Bisphosphonate Complications Including Osteonecrosis of the Jaw. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006; 515:356-60.
20. Hamada H, et al. A simple evaluation method for early detection of bisphosphonate related osteonecrosis of the mandible using computed tomography. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2014; 42:924-29.
21. Angiero F, et al. Osteonecrosis of the jaws caused by bisphosphonates: evaluation of a new therapeutic approach using the Er:YAG laser. *Lasers Med Sci* 2009; 24:849–56.

22. Stubinger S, et al. A Preliminary Report About Treatment of Bisphosphonate Related Osteonecrosis of the Jaw With Er:YAG Laser Ablation. *Lasers in Surgery and Medicine* 2009; 41:26–30.
23. Vescovi P, Manfredi M, Merigo E, Meleti M, Fornaini C, Rocca JP. Surgical approach with Er:YAG laser on osteonecrosis of the jaws (ONJ) in patients under bisphosphonate therapy (BPT). *Lasers Med Sci* 2010; 25(1): 101-13.
24. Pietrokovski J, Massler M. Ridge remodeling after tooth extraction in rats. *J Dent Res.* 1967; 46:222-31.
25. Johansen JR. Repair of the post-extraction alveolus in the Wistar rat. A histologic and autoradiographic study. *Acta Odontol Scand.* 1970; 28:441-61.
26. Kozai Y. Influence of prednisolone-induced osteoporosis on bone mass and bone quality of the mandible in rats. *Dentomaxillofacial Radiology* 2009; 38:34–41.
27. Abtahi J, Agholme F, Sandberg O, Aspenberg P. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw in a rat model arises first after the bone has become exposed. No primary necrosis in unexposed bone. *J Oral Pathol Med.* 2012; 41:494–9.
28. Arce K, Assael LA, Weissman JL, Markiewicz MR. Imaging Findings in Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of Jaws. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009; 67:75-84, Suppl 1.

ANEXO 1
Parecer comitê de ética de pesquisa em animais da UFPE

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
 fax: (55 81) 2126 8350
 www.ccb.ufpe.br



Recife, 29 de Maio de 2013.

Ofício nº 573/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
 Para: **Prof. Luiz Alcino Monteiro Gueiros**
 Departamento de Clínica e Odontologia
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 23076.016751/2013-92

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, “**Avaliação do uso do Laser Er: E Laserterapia no Tratamento de Osteonecrose Mandibular: Estudo Experimental Em Ratos.**”.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Núcleo de Cirurgia Experimental da UFPE.. Animais: ratos; Linhagem: Wistar; Idade: Adultos Peso:220 A 300g; Sexo:Macho; Nº total de animais: 36 ratos.

Atenciosamente,

Profª Tania Rieger
 Presidente do CEUA/CCB-UFPE
 SIAPE 2306924