

Josy Lorena Peres da Silva Vilarinho

**Modelo Animal de Osteonecrose Associada ao Uso de
Bisfosfonato. Avaliação por Microtomografia em três
tempos: inicial, intermediária e final**

BRASÍLIA

2016

Josy Lorena Peres da Silva Vilarinho

**Modelo Animal de Osteonecrose Associada ao Uso de
Bisfosfonato. Avaliação por Microtomografia em três
tempos: inicial, intermediária e final**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Tadeu de Souza Figueiredo

BRASÍLIA

2016

Josy Lorena Peres da Silva Vilarinho

**Modelo Animal de Osteonecrose Associada ao Uso de
Bisfosfonato. Avaliação por Microtomografia em três
tempos: inicial, intermediária e final**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovado em 7 de dezembro de 2016.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Tadeu de Souza Figueiredo (presidente)

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Sérgio Bruzadelli Macedo

Universidade de Brasília

Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo

Universidade de Brasília

Dedico este trabalho, a todos que me apoiaram e me deram suporte para realização e conclusão deste, que foi um projeto de vida por dois anos e meio.

Ao meu querido e paciente esposo, pelo suporte, carinho e paciência durante todo este processo. Aos meus pais, por terem me oferecido o maior bem que uma pessoa pode ter: a educação. E aos meus irmãos, pelo carinho e apoio.

Ao meu Orientador Prof. Paulo por todo suporte, orientação, paciência e estímulos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos queridos Professores Paulo, André Leite e Nilce Melo por toda orientação, apoio e estímulo à pesquisa e pelos exemplos de dedicação e amor à docência e à pesquisa.

Aos Professores Sérgio Bruzadeli, Sasha Braum e João Paulo Longo por todos ensinamentos e suporte técnico durante o experimento.

Às Professoras Eliete Neves e Ana Carolina por toda ajuda e ensinamentos, que possibilitaram uma melhor execução dos trabalhos.

Aos Veterinários Rafael e Ana Luíza, por todo suporte técnico e ensinamentos quanto à ética e ao respeito no uso animal em pesquisas.

À Professora Ana Tereza por sua presteza e contribuição na análise estatística.

Aos técnicos do Biotério, pelos cuidados e dedicação aos animais.

Aos colegas de batalha, Andréia, Raíza, Daniele, Túlio e Nathália, por toda colaboração, apoio e esforços durante a execução da pesquisa.

À FAP-DF pelo suporte financeiro, sem o qual a pesquisa não seria possível.

“A ciência não pode prever o que vai acontecer. Só pode prever a probabilidade de algo acontecer.”

(César Lattes)

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi desenvolver um modelo animal de osteonecrose associada ao uso de medicamentos antirreabsortivos ósseos e antiangiogênicos (MRONJ) em ratas Wistar e analisar as alterações ósseas em mandíbula. As alterações ósseas foram analisadas por meio de exame clínico e microtomografia computadorizada (μ TC) em três momentos, antes do início do experimento, em T_0 ; logo após as três semanas de medicação (zolendronato ou soro fisiológico) em T_1 e antes da exodontia; e seis semanas após a cirurgia, em T_2 . Neste estudo, inicialmente 40 ratas *Wistar* foram avaliadas. Os animais foram divididos em dois grupos (G1 e G2) com diferença de início do G1 para o G2, de uma semana, tendo seguido o mesmo protocolo, de forma independente. Cada grupo foi subdividido em 2 subgrupos. O grupo 1 foi subdividido em Zolendronato 1 (GZ1) e Controle 1 (GC1), recebendo zolendronato e soro fisiológico, respectivamente, ambos 66 μ g/kg, três vezes por semana, durante três semanas; e o Grupo 2: em subgrupo Zolendronato 2 e subgrupo Controle 2 (GC2), receberam zolendronato e soro fisiológico, respectivamente, utilizando o mesmo protocolo de G1. Três semanas após o início da medicação, os ratos foram aleatoriamente selecionados e submetidos à extração do primeiro molar inferior esquerdo. Ao exame clínico, observou-se que nenhum dos animais dos subgrupos controles (GC1 e GC2) desenvolveram a MRONJ. 78% das ratas de GZ1 e GZ2 apresentaram exposição óssea, 22,22% delas tiveram cicatrização clínica completa da região da exodontia, e 28% delas tiveram sequestro ósseo. Após a seleção das regiões de interesse no programa CTan, os seguintes parâmetros ósseos foram medidos na microtomografia computadorizada: densidade mineral óssea (DMO), espessura trabecular (Tb.Th), número trabecular (TB.N), separação trabecular (Tb.Sp.) e dimensão fractal (FD). A média da DMO das ratas do Controle reduziu de T_0 para T_2 . Por outro lado, como esperado, um efeito oposto foi observado no grupo zolendronato, no qual a medida da DMO aumentou. Em relação aos outros parâmetros ósseos, alterações ósseas similares foram observadas entre o grupo controle e o grupo zolendronato. A DF reduziu de T_0 a T_2 . Em ambos os grupos, observou-se também uma redução na espessura trabecular (Tb.Th) e no número trabecular (TB.N) e, conseqüentemente, o aumento na separação das trabéculas ósseas (Tb.Sp). Os resultados sugerem que o comportamento das alterações ósseas observadas pode estar relacionado à redução dos osteoblastos e osteoclastos. Por conseguinte, ocorre a deterioração do colágeno e da matriz óssea e, posteriormente, a separação das trabéculas aumenta em ambos os grupos.

ABSTRACT

The aim of this study was to develop an animal model of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) in *Wistar* rats, and also to investigate bone changes in mandible. Bone changes were evaluated by clinical examination, and microtomography in three different phases of the experiment: before start of the experiment (T_0); after three weeks of medication (zolendronate or saline solution) and before the dental extraction (T_1); and six weeks after surgery (T_2). In this study, initially 40 female Wistar rats were analyzed. The animals were divided in two groups (G1 and G2) with a G1 to G2 start difference of one week, both following the same trial protocol, independently. Each group was subdivided in 2 subgroups. The group 1 was subdivided in Zolendronate 1 (ZA1) and Control 1 (C1), received Zometa[®] and saline solution, respectively, both 66 $\mu\text{g}/\text{kg}$, three times a week, for 3 weeks; and the group 2, in Zolendronate 2 (ZA2) and Control (C2), both used the same G1 medication protocol. Three weeks after beginning the medication, the rats were randomly selected and submitted to the extraction of the lower left first molar. On clinical examination, it was observed that none of the animals of the control subgroups (C1 and C2) developed MRONJ. 78% of the ZA1 and ZA2 rats presented bone exposure and 22.22% of these rats had complete wound healing in the surgical area. The quantitative analyses were made using the program DataVivier, calculating the highest height of the osteolytic lesions among the sections of the μCT . After selecting a region of interest (ROI) by using the software CTan, several bone parameters were measured on the microcomputed tomography scans, as follows bone mineral dimension (DMB), bone trabecular thickness (Tb.Th), bone trabecular number (Tb.N), bone trabecular separation (Tb.Sp) and fractal Dimension (FD). The mean BMD of the control rats decreased from T_0 to T_2 . On the other hand, as expected, an opposite effect was observed in the zolendronate group, in which the mean BMD increased. Regarding the other bone parameters, similar bone changes were observed between control and zolendronate groups. FD reduced from T_0 to T_2 . On both groups, it was also observed a reduction of the trabecular thickness (Tb.Th) and the trabecular number (Tb.N), and consequently, the increasing of the spaces between trabeculae (Tb.Sp). The results suggest that the observed behavior of bone changes were due to the reduction of osteoblasts and osteoclasts. Therefore, the deterioration of the collagen and osseous matrix occur and, posteriorly, the spaces between trabeculae increase on both groups.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. A. Fórmula química dos pirofosfatos inorgânicos; B. Estrutura química básica dos Bisfosfonatos; C. Estruturas químicas dos seis BFs mais comuns.	20
FIGURA 2. Distribuição dos animais no período de aclimação do G1 e G2.	35
FIGURA 3. Distribuição dos grupos G1 e G2; e em experimentais e controles.	36
FIGURA 4. Timeline do experimento.	38
FIGURA 5. Imagens 5A-5E	41
FIGURA 6. Imagens 6A-6E	42
FIGURA 7. Imagens 7A-7D	43
FIGURA 8. Imagens 8A-8D	44
FIGURA 9. Imagens 9A-9E	45
FIGURA 10. Distribuição das perdas por cada subgrupo	47
FIGURA 11. Frequências relativas percentuais da ocorrência de características nos grupos Controle e Tratado.	50
FIGURA 12. Médias e intervalos de confiança (95%) da densidade mineral óssea em relação aos grupos experimentais.	53
FIGURA 13. Médias e intervalos de confiança (95%) da espessura das trabéculas (TbTH) em relação aos grupos experimentais.	54
FIGURA 14. Médias e intervalos de confiança (95%) do número das trabéculas ósseas (Tb.N) em relação aos grupos experimentais.	55
FIGURA 15. Médias e intervalos de confiança (95%) do espaçamento das trabéculas ósseas (TbSp) em relação aos grupos experimentais.	56
FIGURA 16. Médias e intervalos de confiança (95%) da dimensão fractal do trabeculado ósseo em relação aos grupos experimentais.	57
FIGURA 17. Imagens 17A-17F.	58
FIGURA 18. Imagens 18A-18F.	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Apresentações farmacêuticas do zolendronato.....	23
Quadro 2. Estágios e estratégias de tratamento para MRONJ.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frequências absoluta e relativa percental das características clínicas observadas em relação aos grupos controle e tratado com zolendronato.	49
Tabela 2. Frequências absoluta e relativa percental das características clínicas observadas em relação aos grupos controle e tratado com zolendronato.	49
Tabela 3 . Médias e Desvios Padrão de variáveis analisadas em função dos grupos ao longo dos três momentos de experimentação.	51
Tabela 4. Tabela Resumo interpretativa da tabela 3.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAOMS	Associação Americana de Cirurgiões Bucomaxilofaciais
AppCp	Adenosina-5'-[(β , γ)- metileno] trifosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BF(s)	Bifosfonato(s)
BRONJ	Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (osteonecrose maxilomandibular associada ao uso de bifosfonatos)
Cdc42	Proteína da subfamília das GTPases
DMO	Densidade Mineral óssea
Ex.Cl.	Exame Clínico
FPP	Farnesil difosfato
FD	Dimensão fractal
GGPP	Geranylgeranylpirofosfatase sintase
GTP	Guanosina trifosfato
GTPase	Enzimas hidrolases que se ligam e hidrolisam a GTP.
GC1 e GC2	Subgrupos Controles um e dois
GZ1 e GZ2	Subgrupos Zometas um e dois
G1 e G2	Grupos um e dois
IV	Intravenoso
kg	Quilograma
MDP	Metileno difosfato
MicroPET	Microtomografia por Emissão de Pósitrons
MicroCT	Microtomografia Computadorizada
mg	Miligrama
MRON	Medication-related osteonecrosis (osteonecrose associada ao uso de medicamento antirreabsortivos ou antiangiogênicos)
MRONJ	Medication-related osteonecrosis of the jaw (osteonecrose maxilomandibular associada ao uso de medicamento antirreabsortivos ou antiangiogênicos)
ONJ	Osteonecrosis of the jaw (osteonecrose maxilomandibular)
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
R1	Radical um da fórmula química geral do BF
R2	Radical dois da fórmula química geral do BF

Rac	Proteína da subfamília das GTPases
Ras	Proteína da subfamília das GTPases, que tem o papel principal de regular o crescimento celular
Rho	Proteína da subfamília das GTPases, que tem o papel na reorganização do citoesqueleto
ROI	Área de interesse definido em 3D na imagem para cálculos definidos, a fim de se obter análise quantitativa das alterações ósseas.
Tb.N	Número trabecular ou de trabéculas
Tb.Th	Espessura trabecular óssea
TC	Tomografia Computadorizada
Tc	Elemento químico sintético Tecnécio de número atômico 43
UI	Unidade Internacional
3D	Tridimensional ou três dimensões
μ TC	Microtomografia Computadorizada
μ TC0	Microtomografia Computadorizada inicial
μ TCi	Microtomografia Computadorizada intermediária
μ TCf	Microtomografia Computadorizada final
μ g	Micrograma
μ m	Micrômetro

SUMÁRIO

1. Introdução	15
2. Revisão da Literatura	19
2.1. Conceito dos Bifosfonatos	19
2.1.1. Farmacocinética	20
2.1.2. Farmacodinâmica	20
2.1.3. Apresentação Farmacêutica do Zolendronato	22
2.2. MRONJ	23
2.2.1. Incidência e Prevalência	23
2.2.2. Patogênese	24
2.2.3. Fatores de risco	24
2.2.4. Estágios e Tratamentos	25
2.3. Microtomografia Computadorizada	26
2.4. Modelos Animais	27
3. Objetivos	31
3.1. Objetivo Geral	31
3.2. Objetivos Específicos	31
4. Métodos	33
4.1. Desenho Experimental e Protocolo de Medicação	34
4.1.1. Desenho Experimental	34
4.1.2. Protocolo de Medicação	34
4.2. Microtomografia e Procedimento Cirúrgico	35
4.2.1. Microtomografia Inicial	35
4.2.2. Medicação	36
4.2.3. Microtomografia Intermediária	36
4.2.4. Extrações dentárias e pós operatório	36
4.3. Evolução pós cirúrgica	37
4.4. Escaneamento por microtomografia computadorizada	38
4.4.1. Análises das microtomografias computadorizadas	38
4.5. Análise Estatística	38
5. Resultados	46
5.1. Perda de amostra	46
5.1.1. Motivos das perdas	46
5.2. Análise Qualitativa da Amostra	46
5.2.1. Características Clínicas	47
5.2.2. Características Microtomográficas	48
5.3. Análise Quantitativa da Amostra	49
5.3.1. Parâmetros ósseos microtomográficos	49
6. Discussão	59
7. Conclusões	65
Referências	67
Anexo	73
Apêndice	75

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os Bisfosfonatos (BFs) são agentes antirreabsortivos, com diferentes mecanismos de ação osteoclástica, e têm sido usados amplamente para tratamento de osteoporose, bem como em tratamentos de metástases ósseas, mieloma múltiplo e doença de Paget, promovendo boa eficácia terapêutica nessas doenças (Bi et al., 2010; Kämmerer et al., 2015; Kim et al., 2015; Lang M et al., 2016; Pichardo S et al., 2016; Sentürk et al., 2016; Valachis et al., 2013). Segundo Ruggiero, (2007), a terapia com BFs tem exercido um impacto significativo na morbidade de pacientes em tratamento paliativo, pois, como efeito principal, a medicação reduz as lises ósseas mediadas por osteoclastos em metástases ósseas para mieloma múltiplo, câncer de mama e dentre outros tumores.

O efeito adverso mais sério da terapia com os BFs é a osteonecrose associada ao uso deste fármaco, em região de mandíbula e maxila, antes conhecida como osteonecrose associada ao uso de bifosfonatos ou BRONJ e atualmente denominada osteonecrose associada ao uso de medicamentos antirreabsortivos ou antiangiogênicos - MRONJ (Franco et al., 2014; Sentürk et al., 2016; Ruggiero et al., 2014; Zandi et al., 2016; Howie et al., 2015). Ruggiero, (2007), relatou que os BFs são preferencialmente depositados em ossos com altas taxas de remodelação, como mandíbula e maxila, sendo um dos possíveis motivos desse efeito adverso estar mais prevalente nesses ossos.

Este efeito adverso foi descrito pela primeira vez em 2003 por Marx et al. De acordo com a American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) – 2014 update, MRONJ é a presença de exposição óssea ou osso necrótico em maxila ou mandíbula, por mais de oito semanas, em pacientes que fazem ou fizeram uso de algum tipo de antirreabsortivo (bifosfonatos e denosumab) e terapias antiangiogênicas; sem histórico de radioterapia em região de cabeça e pescoço, e com ausência de doença metastática em mandíbula e maxila (Ruggiero et al., 2014).

A MRONJ pode estar associada a lesão traumática dentária prévia ou mesmo de forma espontânea em pacientes que fazem ou fizeram uso de algum tipo de BFs (Marx, 2003; Franco et al., 2014; Howie et al., 2015). Embora, o mecanismo exato da MRONJ não tenha sido determinado, existem diversas hipóteses.

Na maioria dos casos, a patogênese do processo é consistente com um defeito na remodelação óssea ou na cicatrização de feridas. Afinal, sendo um supressor da atividade osteoclástica, os BFs reduzem o processo de remodelação, aumentando a densidade mineral

óssea, reduzindo assim, o risco de fratura. Suas propriedades antiangiogênicas podem afetar o suprimento sanguíneo ósseo, levando a uma aparente isquemia no osso da mandíbula e maxila, notada em pacientes em tratamento com BFs. Assim, uma necrose a partir de um trauma, com a dificuldade de suprimento sanguíneo no local, dificultaria o reparo e favoreceria o desenvolvimento de uma osteonecrose (Ruggiero, 2007). Howie et al., (2015) sugerem a necessidade de um tripé para formação da MRONJ, em que o uso do BF (dependo do tipo e duração terapêutica), aliado a um trauma local (ligado ao grau de invasividade) e somada à resposta óssea local, relacionada ao tipo de resposta individual (sistema imunológico e genética) atuariam em conjunto como agentes etiológicos da doença.

Os autores relatam também que existem diversos tipos de BFs, nitrogenados e não-nitrogenados, orais ou intravenosos, entretanto, os nitrogenados intravenosos são os mais potentes e possuem maior risco para a MRONJ. Dentre eles, o ácido zolendrônico é o mais potente deles e o de maior risco para MRONJ (Howie et al., 2015).

Ruggiero, (2007); Lesclous et al., (2009); Rasmusson e Abtahi (2014) relataram que a microbiota da cavidade bucal, por potencialmente favorecer a processo patogênico e inflamatório da extração dentária, podendo levar a uma osteomielite, também é um fator que aumenta o risco de osteonecrose em mandíbula e maxila.

Os aspectos radiográficos da MRONJ, apesar de serem inespecíficos, incluem esclerose óssea, alterações osteolíticas, sequestro ósseo, reação periosteal e fratura mandibular. O exame radiográfico de escolha para a avaliação da doença é geralmente a tomografia computadorizada (TC), pelo fato de ser significativamente mais sensível às alterações da mineralização óssea e por oferecer uma melhor resolução de imagem (Arce et al., 2009; Chiandussi et al., 2006; Treister et al., 2010).

Estas alterações são detectadas, geralmente, nos momentos clínicos mais críticos, de maior severidade da doença, quando as possibilidades terapêuticas são reduzidas e quando o paciente procura por tratamento. Como se trata de um efeito adverso em resposta aos medicamentos antirreabsortivos, sendo de certa forma, uma idiossincrasia, não há como prever qual paciente será afetado. Portanto, se fosse estabelecido a etiopatogenia, ou o mecanismo exato de desenvolvimento da MRONJ, poder-se-ia pensar em cuidados preventivos de maneira mais específica. Em meio a essas incertezas e pela gravidade dos casos, os modelos animais para o estudo da MRONJ têm como objetivo reproduzir as alterações encontradas nos humanos, com o intuito de elucidar a fisiopatologia, o aspecto imagenológico, a profilaxia e o tratamento da doença e, neste contexto, diversos modelos têm

sido propostos (Abtahi et al., 2012; Allen & Burr, 2008; Ali-Erdem et al., 2011; Bi et al., 2010; Biasotto et al., 2010; Hokugo et al., 2010; Huja et al., 2011; Kobayashi et al., 2010; López-Jornet et al., 2010; Marino et al., 2012; Perilli et al., 2010; Senel et al., 2010; Howie et al., 2015; Zandi et al., 2015).

Mesmo diante desses variados modelos animais e de vários pesquisadores debruçados sobre o tema, não há avanços significativos no âmbito da compreensão da patogenia da MRONJ. Como para a maioria dos quadros nosológicos crônicos (segundo dicionário de língua portuguesa, Nosos = Enfermidade; Logos = Razão, princípio que permite explicar algo) , para a MRONJ parece válida a máxima de que o diagnóstico precoce oferece melhores chances aos pacientes. Assim, o objetivo desse trabalho foi contribuir para a compreensão da patogenia da MRONJ, usando-se um modelo animal e lançando mão da microtomografia em três diferentes momentos, (primeira, antes do uso de BF; segunda, após uso de BF e antes do trauma; e terceira, após uso de BF e pós exodontias). Desta forma, no desenho desta pesquisa, a avaliação microtomográfica inicial foi executada para se verificar a normalidade óssea anterior ao tratamento; a avaliação intermediária para se verificar separadamente, a influência do uso da medicação antireabsortiva e do trauma na microarquitetura óssea animal, mirando-se especificamente a bicorticalização; e, por fim, a avaliação final, feita para estabelecer o diagnóstico de MRONJ.

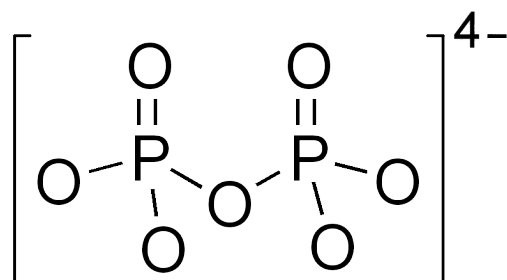
2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

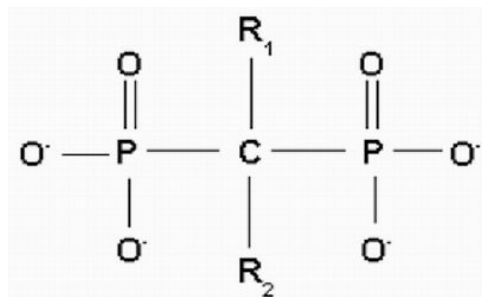
2.1. CONCEITO DOS BISFOSFONATOS

Os Bisfosfonatos (BFs) são análogos sintéticos dos pirofosfatos inorgânicos, encontrados no radiofármaco Tc99mMDP (technetium 99 m methylene diphosphonate), utilizados nos exames de cintilografia óssea. Ao contrário dos pirofosfatos inorgânicos, que possuem um tempo de meia-vida curto, de aproximadamente 6 horas, ideal para exames de imagem da medicina nuclear, os BFs se acumulam na matriz óssea, por adsorção e incorporação à estrutura da hidroxiapatita, mantendo-se por um longo tempo e gerando assim, seus efeitos farmacológicos desejáveis e adversos (Rasmusson e Abtahi, 2014; Zandi et al., 2015).

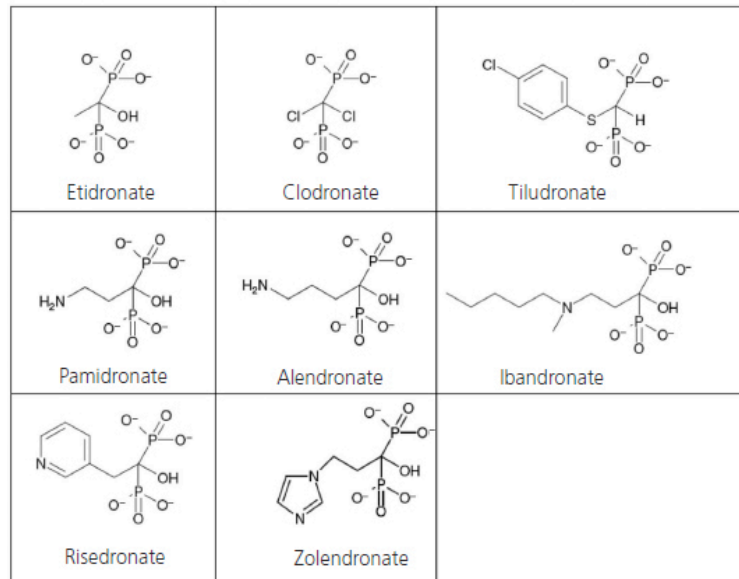
Existem dois grupos fosfatos na estrutura dos BFs essenciais para sua ligação à hidroxiapatita, são chamados radicais R1 e R2. O radical R1 pode ser o radical hidróxi ou o radical amino. Eles exercem a função de “ganchos” (bone hook), ligando o BF à hidroxiapatita. O R1 age na estrutura aumentando sua afinidade pelo cálcio da hidroxiapatita. Já o radical R2 atua determinando a potência antirreabsortiva, melhorando a ligação do BF à hidroxiapatita. Entretanto, com a evolução dos BFs, hoje os mais potentes, Risedronato e Zolendronato, possuem um nitrogênio em um anel heterocíclico (Rasmusson e Abtahi, 2014). A figura 1 apresenta a fórmula química dos pirofosfatos orgânicos, a estrutura química básica dos BPs e a estrutura das principais classes dessa medicação.



A. Fórmula química dos Pirofosfatos (pt.wikipedia.org)



B. Estrutura química básica dos Bisfosfonatos (Gutta & Louis, 2007).



C. farmácia.uniso.br

Figura 1. A. Fórmula química dos pirofosfatos inorgânicos; B. Estrutura química básica dos Bisfosfonatos; C. Estruturas químicas dos oito BFs mais comuns.

2.1.1. Farmacocinética

De maneira geral, a absorção gastrointestinal do Bifosfonatos orais é baixa (biodisponibilidade de 0,3%-0,7%), por serem hidrofílico, possuem assim, dificuldade de transpor barreiras epiteliais. Desta forma, sua absorção deve ser paracelular. Os BFs são ionizados no sangue e transportados via plasma sanguíneo. Seu tempo de meia-vida no plasma é de uma à duas horas, sendo de rápida eliminação, devido à sua alta afinidade óssea e sua rápida incorporação pela mesma (Rasmusson e Abtahi, 2014).

2.1.2. Farmacodinâmica

Os BFs são fármacos anticatabólicos, que exercem um efeito inibidor nos osteoclastos. São utilizados em tratamentos de doenças com aumento da reabsorção óssea, tais como, osteoporose primária e secundária, hipercalcemia, doenças de Paget, mieloma múltiplo e doenças ósseas metastáticas. Os estudos mostram que os BFs previnem a perda óssea e aumentam a resistência óssea (Bi et al., 2010; Franco et al., 2014; Kämmerer, 2015; Rasmusson e Abtahi, 2014; Sentürk et al., 2016; Valachis et al., 2013; Xue et al., 2014).

Existem três gerações de BFs, sendo os da primeira geração (medronato, clodronato e etidronato) não nitrogenados, os menos potentes e em alguns casos, podendo causar desmineralização óssea (Goodman e Gilman, 2006). O Clodronato entram nos osteoclastos e são incorporados por análogos não hidrolisáveis de ATP e convertidos em AppCp, análogo ao ATP, que se acumulavam de forma tóxica nas mitocôndrias, alterando sua função e induzindo a apoptose dos osteoclastos (Rasmusson e Abtahi, 2014).

Os BFs da segunda geração, também chamados de aminobifosfonatos (alendronato e pamidronato), são de 10 a 100 vezes mais potentes que os da primeira geração. E os da terceira geração (risedronato e zoledronato), que são os mais modernos, cerca de 10.000 a 100.000 vezes mais potentes que os da primeira e com efeitos mais prolongados. Os BFs de segunda e terceira geração por conterem o nitrogênio em sua fórmula química, são chamados de nitrogenados (Goodman e Gilman, 2006). Os BFs nitrogenados, após sua absorção pelos osteoclastos, atuam inibindo a farnesil pirofosfatase sintase (FPP) e a geranylgeranylpirofosfatase sintase (GGPP), duas enzimas chaves para via mevalonate, dificultando a ativação das pequenas vias das GTPases (Ras, Rho, Rac e Cdc42). Essas GTPases são proteínas sinalizadoras importantes que regulam a morfologia, arranjo do citoesqueleto, tráfego e sobrevivência celular dos osteoclastos. Existem indícios, que estes mesmo efeitos seriam causados nos osteoblastos (Rasmusson e Abtahi, 2014).

O zoledronato, que contém um átomo de hidrogênio dentro de um anel heterocíclico, é o BF intravenoso mais utilizado para os tratamentos de metástases ósseas, principalmente em casos de cânceres de próstata e mama. É considerado o mais potente dos BFs e de efeitos mais prolongados (Tseng et al., 2015). Além disso, ele apresenta um perfil farmacológico único, que tem sido associado não apenas com uma alta afinidade pela hidroxiapatita e alto potencial antirreabsortivo, mas também, com uma maior atividade antitumoral, quando comparado aos outros BFs (Valachis et al., 2013).

A excreção da droga é renal e sua taxa de meia-vida no osso é influenciada pela taxa de remodelação óssea (Rasmusson e Abtahi, 2014).

2.1.3. QUADRO 1: Apresentação farmacêutica do zolendronato

Tipo de BF	Princípio Ativo	Nome Comercial (Laboratório)	Apresentação farmacêutica. Indicação. Dose Usual.
BFs Nitrogenados	Zolendronato	Ácido Zoledrônico	Ácido zoledrônico monoidratado. Inibidor da reabsorção óssea. Frasco ampola de 5 ml de solução injetável com 4 mg. Infusão de 4mg por, uma vez ao mês.
		Aclasta (Norvatis)	Ácido zoledrônico anidro. Inibidor de reabsorção óssea. Frasco de 100 ml com 5 mg para infusão IV. Infusão de 5 mg, uma vez ao mês.
		Blaztere (Dr.Reddy`s)	Ácido zoledrônico anidro. Inibidor de reabsorção óssea. Frasco de 5 ml com 4 mg para infusão IV. Infusão de 5 mg, uma vez ao mês.
		Zolibbs (Libbs)	Ácido zoledrônico. Hipercalemia induzida por tumores. Frasco de 5 ml com 4 mg para infusão IV. Infusão de 5 mg, uma vez ao mês.
		Zometa (Novartis)	Ácido zoledrônico. Hipercalemia induzida por tumores. Frasco de 5 ml com 4 mg para infusão IV. Infusão de 5 mg, uma vez ao mês

*Adaptado de Luz (2013).

2.2. OSTEONECROSE ASSOCIADA AO USO DE MEDICAMENTOS (MRONJ)

O primeiro artigo descrevendo osteonecrose em mandíbula (ONJ) foi publicado por Marx et al. em 2003. Este, mostrou evidências de que os bifosfonatos que causam osteonecrose em mandíbula e maxila (MRONJ) são os nitrogenados (pamidronato, zoledronato, alendronato e risedronato), pois ao contrário dos não-nitrogenados, eles são de difícil metabolização, acumulando-se nos ossos e aumentando assim, seus efeitos a longo prazo. Das drogas citadas, as de via oral são alendronato e risedronato.

Os sinais e sintomas da MRONJ são dor, mobilidade dentária, aumento de volume/inchaço na mucosa bucal, eritema, ulceração, exposição óssea com presença de massa cinzenta caracterizando osso necrótico (Rasmusson e Abtahi, 2014).

A nomenclatura comum para a condição era inicialmente BRONJ (bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw), porém desde 2014, tem preconizado o termo MRONJ, pois acrescenta outros grupos de fármacos antirreabsortivos (denosumab) e antiangiogênicos, que também compartilham deste mesmo efeito adverso importante (Senturk et al., 2016).

2.2.1. Incidência e prevalência

Segundo Ruggiero et al., (2009), a MRONJ não é específica de gênero e pode ocorrer em maxila, mandíbula ou em ambas. Incidência tem sido maior (cerca de 65%) na mandíbula e menor (aproximadamente 26%), na maxila (Howie et al., 2015). Os autores relatam que isto pode ser reflexo da alta incidência de câncer de mama, sobretudo pelo aumento crescente do número de mulheres pós-menopausa que fazem uso de terapias hormonais. Além disso, o fato de haver uma maior prescrição de BFs orais para pacientes com osteoporose pós-menopausa, pode ajudar a justificar tais dados. E Benlidayi et al., (2013) relatam uma variação nas taxas de risco absoluto de MRONJ em pacientes que fazem uso contínuo de BFs orais de 0,46% a 0,99%.

Estimativas da incidência cumulativa da osteonecrose são limitadas e pouco estudadas, mas entre os pacientes tratados com infusões IV (intravenosas) de bifosfonatos, parecem variar entre 0,8 e 12%. (Leite et al., 2006; Ruggiero et al., 2004; Ruggiero, 2007). Valashis et al., (2013) mostraram em uma metanálise, uma incidência de 0,52% de MRONJ em pacientes com câncer de mama em uso de zoledronato e uma redução no risco de morte de 19% nestes pacientes. Howie et al., (2015) relataram que nos pacientes com câncer que recebem infusão intravenosa de 4mg de zoledronato, por 15 minutos de três em três semanas ou mensalmente, existe uma prevalência de MRONJ de 7,7%, se a terapia ocorrer de forma contínua por 37 a

48 meses. Além disso, é esperado um aumento deste valor de acordo com o aumento do tempo terapêutico.

2.2.2. Patogênese

O mecanismo pelo qual os bifosfonatos causam osteonecrose ainda é incerto, mas há crescente evidência sobre seu papel na indução de alteração na remodelação óssea fisiológica e na cicatrização das feridas (Kumar et al., 2010; Ruggiero, 2011; Xue et al., 2014). Weinstein et al. (2009) mostraram que os bifosfonatos podem prolongar a vida dos osteoclastos e retardar a apoptose, enquanto que Lesclous et al. (2009) demonstraram o papel da inflamação local ou trauma na iniciação da osteonecrose.

Landesberg et al. (2008) verificaram que os BFs inibem a proliferação de células da mucosa bucal e alteram o processo de cicatrização. Scheper et al. (2009) também obtiveram resultados semelhantes e concluíram que o ácido zoledrônico tem efeitos deletérios nos fibroblastos gengivais e em queratinócitos, colaborando com os esses efeitos. Rasmusson e Abtahi (2014) relatam que há especulação de que os BFs poderiam inibir o crescimento endotelial dos vasos sanguíneos, tendo uma ação antiangiogênica, que tem sido observada cada vez mais nos estudos recentes. Eles também constata as crescentes evidências de que sua origem é multifatorial, em que o biofilme seria de fundamental preponderância, especificamente as bactérias *Actinomyces* e *Staphylococcus*, para o início de uma osteomielite crônica, que seria o primeiro passo para MRONJ. Por estas evidências, os autores relatam que antibioticoprofilaxia e terapia, teriam um papel importante nos procedimentos que causam trauma/injúria, como as exodontias, de forma a prevenir uma possível osteomielite crônica, que poderia levar à osteonecrose. Além disso, a possível redução da microcirculação da gengiva causada pelos BFs dificultaria a cicatrização do tecido mole.

2.2.3. Fatores de risco

Benlidayi et al (2013) citam como sendo os principais fatores de risco:

- Potência dos BFs, sendo os intravenosos, por causa de sua alta biodisponibilidade e durabilidade de ação (nitrogenados), os mais potentes.
- Duração da terapia - 2 à 4,2 anos para os BFs orais; e 1,8 anos para ácido zoledrônico.
- Fatores de risco locais:

- Procedimentos que causem injúria óssea, tais como, extrações dentárias, cirurgias periapicais e periodontais, implantes dentários.
- Microbiota bucal;
- Higiene bucal deficitária, inclusive má higiene de próteses removíveis. Estes fatores podem atuar sozinhos ou concomitantes com o trauma ósseo, potencializando-os.
- Fatores sistêmicos:
 - Diálise renal, taxa de hemoglobina baixa, obesidade, imunossupressão, artrite reumatoide, fumo e diabetes.
 - Idade – aumento do risco de acordo com o seu aumento, principalmente após os 65 anos.

2.2.4. Estágios e tratamento

Segundo Ruggiero et al., (2014) houve algumas modificações na classificação dos estágios e categorias de risco da MRONJ com o intuito de facilitar prevenção e tratamento da mesma. Atualmente, se preconiza o estadiamento descrito na tabela seguinte:

QUADRO 2: ESTÁGIOS E ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO

Estágios da MRONJ	Características	Estratégias
<i>Categoria de risco</i>	Sem sinais e sintomas em pacientes em uso de BFs oral ou IV.	Sem indicação de tratamento; Orientações quanto à Higiene Oral e quanto aos risco.
<i>Estágio 0</i>	Ausência clínica de osso necrótico, mas com achados clínicos inespecíficos, alterações radiográficas ou sintomas.	Conduta sistêmica, incluindo medicações para dor e antibióticos.
<i>Estágio 1</i>	Exposição de osso necrótico ou detecção de fístula na sondagem. Assintomático e sem	Prescrição de bochecho antimicrobiano; Acompanhamento trimestral;

	evidências de infecção. Achados radiográficos podem classificá-lo como estágio 0.	Orientação do paciente e revisão pelo médico prescritor à respeito das indicações do uso continuado de BF.
<i>Estágio 2</i>	Exposição de osso necrótico, com fistula na sondagem, com evidências de infecção e presença de sintomas.	Prescrição de antibiótico via oral, bochecho antimicrobiano, analgesia, debridamento dos tecidos moles para remoção de fatores irritantes.
<i>Estágio 3</i>	Osso necrótico exposto, mais dos seguintes achados: osso necrótico se estendendo abaixo do osso alveolar, como borda inferior e ramo mandibular ou região zigomática e seios maxilares, na maxila; fratura patológica; fistula extra oral; comunicação antrobucal ou nasobucal; extensão osteolítica para borda inferior mandibular ou assoalho sinusal.	Prescrição de bochecho antimicrobiano; Terapia antibiótica e analgesia; Ressecção ou debridamento cirúrgico como método paliativo de longo prazo de infecção e dor.

Modificado. Ruggiero et al., 2014

2.3. MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA

A esclerose óssea, alterações osteolíticas, sequestro ósseo, reação periosteal e fratura mandibular são os aspectos radiográficos qualitativos encontrados na MRONJ. O exame radiográfico de escolha para a avaliação da doença é geralmente a tomografia

computadorizada (TC) por ser significativamente mais sensível a alterações da mineralização óssea e oferecer melhor resolução de imagem (Arce et al., 2009; Chiandussi et al., 2006; Treister et al., 2010). Entretanto, a avaliação por tomografia por emissão de pósitrons (PET) aliada à tomografia computadorizada vem mostrando excelentes resultados. O PET avalia melhor a atividade metabólica e função fisiológica, ao invés de estrutura anatômica. Desta forma, a associação de ambos, mostra-se um instrumento de excelência para estudo em ossos, pois mensura a atividade osteoblástica e remodelação óssea, aliada a análise morfológica (Koba et al, 2013).

A microtomografia computadorizada (microTC) pode alcançar uma resolução na imagem de até 1.000.000 de vezes maior que a da tomografia computadorizada e pode ser considerada o padrão-ouro para avaliação de pequenos animais.

Bi et al. (2010) desenvolveram um modelo animal com ratos e em sua avaliação por meio da microTC, observou esclerose óssea, sequestro ósseo, osso alveolar avascular e radiopaco. Já no experimento de Aghaloo et al. (2011), a microtomografia computadorizada revelou osteonecrose com presença de sequestros ósseos e extensa formação óssea alveolar periosteal nas regiões de periodontite induzida por ligadura nos animais tratados com bifosfonatos. Segundo, Kammerer, (2015), a tomografia computadorizada teria habilidade para detectar mudanças estruturais precocemente, tais como esclerose óssea, sequestro ósseo e alterações na cortical e trabeculado ósseo, quando comparada às radiografias convencionais. No entanto, nos modelos animais de MRONJ relatados na literatura, observam-se significativas diferenças metodológicas com respeito às medicações, em diferentes doses e em animais distintos. Além disso, os estudos em animais que avaliaram especificamente as alterações imagenológicas associadas à MRONJ são escassos.

2.4. MODELOS ANIMAIS

Diversos estudos com uso animal têm sido realizados a fim de estudar as relações entre osteonecrose em mandíbula e maxila e o uso de bifosfonatos. E a pesquisa com modelo animal, favorece o estudo à respeito da patogênese da MRONJ. Pois, é possível se ter um maior controle dos fatores externos que poderiam agir como confundidores, tendo assim, resultados mais precisos, dispondo de diferentes ferramentas de estudo.

Abtahi et al. (2013), em um estudo a partir de cobertura com retalho mucoperiosteal em modelo animal, em que objetivaram a prevenção da MRONJ, concluíram que a causa primária da osteonecrose seria a infecção bacteriana. O trabalho de Pautke et al. (2012) avaliaram a

relação da MRONJ em animais que tiveram dentes extraídos e concluíram que o uso do bifosfonato induziu a osteonecrose.

Howie et al., (2015) relataram que em 2014, a AAOMS enfatizou a necessidade de modelos animais confiáveis, que poderiam ser utilizados em tratamentos potenciais e protocolos de prevenção. Pois embora muitos modelos animais tenham sido descritos na literatura, a maioria, envolvem outras condições, tais como periodontites, doenças periapicais, deficiência em vitamina D ou terapia com dexametasona. Segundo os autores, para induzir a MRONJ, faz-se necessário um tripé envolvendo a indução pela droga, a resposta óssea e a invasividade do trauma ósseo local.

O protocolo utilizado no presente estudo foi baseado no estudo de Luz et al., (2013) e embasado em outros modelos de estudo como Zandi et al., (2015); Bi Yanming et al., (2010); Howie et al., (2015); Takaoka et al., (2015); Córdova., (2016). Zandi et al., (2015) objetivando a obtenção de um protocolo com melhor custo e benefício, tanto em quantidade de materiais, quanto menor sofrimento animal, utilizaram a dosagem de 0.06mg/Kg (60µg/Kg) uma vez por semana, durante quatro semanas; então, realizaram a eutanásia e exame histopatológico, na primeira, segunda, terceira e quarta semana. Os autores observaram presença de MRONJ em grande parte dos animais, a partir da terceira semana após extração, e de 83%, na quarta semana. Concluíram ao final do estudo, que o aumento do tempo da terapia não estaria associado ao aumento do número de ratas diagnosticadas com MRONJ, pois a taxa de 83% é a observada também em estudos prévios de oito semanas. Isso ocorre, pelo fato de a doença se manifestar de forma diferente entre humanos e ratos.

Baseado na conclusão acima e visando os mesmo objetivos, é que ao invés de aguardar por oito semanas, o trabalho presente irá se utilizar de apenas seis semanas após a exodontia para a avaliação final. Uma média do tempo de diagnóstico humano (oito semanas) e as quatro semanas do estudo de Zandi et al., (2015).

Contudo, os objetivos desta pesquisa com uso de modelo animal foi analisar os efeitos do Zometa® na mandíbula de ratas Wistar em três tempos distintos, para caracterizar as suas alterações ósseas, como por exemplo, a bicorticalização. Assim, buscou-se certificar da temporalidade das alterações ósseas, por meio da análise microtomográfica em três fases diferentes (antes do BF, após uso de BF e antes do trauma, e após uso de BF e pós exodontias). Estes dados, aliados à avaliação clínica final para diagnóstico de MRONJ e às imagens microtomográficas finais após seis semanas do trauma cirúrgico, ofereceram as análises qualitativa e quantitativa das alterações ósseas mandibulares provocadas pelo

zolendronato, de forma mais ampla, para contribuir para a compreensão da patogênese da doença.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do zolendronato em mandíbulas de ratas, a partir de análises clínicas e microtomográficas em três momentos distintos, a fim de se compreender melhor a patogênese da MRONJ.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar clinicamente a presença de osteonecrose.
- Certificar da temporalidade das alterações ósseas, por meio da análise microtomográfica em três fases diferentes da pesquisa.
- Avaliar a associação: **trauma** como potencializador da MRONJ
- Avaliar presença de alterações ósseas **precoces** (antes do trauma)

4. MÉTODOS

4. MÉTODOS

Protocolo de experimentação animal submetido à Comissão de Ética no Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (CEUA, UnB, Brasília, Brasil) aprovado em 18 de março de 2015 (UnBDOC 5772/2015). Este trabalho foi fomentado pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) sob o Projeto de nº 736/2015 e Processo de nº 0193.000971/2015.

A amostra incluiu 40 ratas fêmeas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com peso inicial aproximado de 180g e com idade aproximada de 30 dias. Os animais foram alocados no Biotério de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília e aclimatados por duas semanas antes do início do experimento. Os animais foram adquiridos no Biotério da Universidade de São Paulo (USP) e transportados via aérea pela TAM aviação, que somente transportava 16 animais por voo. Como só havia 2 voos que eram concomitantes com os dias de fornecimento dos animais pela USP, semanalmente, só havia como serem entregues no máximo 32 animais. Os animais aportavam no Aeroporto Internacional de Brasília aproximadamente, 24 horas depois e eram transportados pela empresa Teel Cargo até o biotério da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB, onde eram recebidos e examinados pelos veterinários responsáveis, Rafael Rocha de Andrade, CRMV DF -1604 e Ana Luíza Sarkis Vieira, CRMV DF-2926. Após aclimação de 15 dias, os animais foram aleatoriamente redistribuídos em caixas de polipropileno com tampa zincada. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12h (ciclo claro com início às 7:00h AM), em temperatura média de $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ e com acesso à ração e água à vontade.

Os animais foram distribuídos em dois grupos G1 e G2, pois pelo fato de chegarem apenas 32 animais em cada semana, o número total de 40 ratas, foi completado na semana seguinte. Por este motivo, foram montados dois grupos independentes, com diferença de uma semana de início cada um, mas seguindo o mesmo protocolo. Cada grupo (G1 e G2) foi subdividido da mesma maneira, explicado na **FIGURA 2** abaixo:

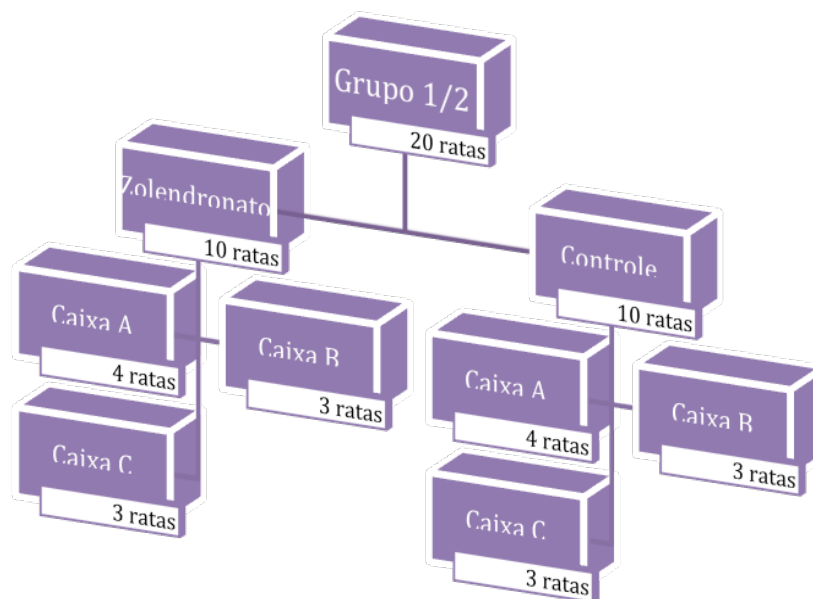


FIGURA 2: Distribuição dos animais no período de aclimação do G1 e G2.

4.1. DESENHO EXPERIMENTAL E PROTOCOLO DA MEDICAÇÃO

4.1.1. Desenho experimental

O desenho experimental foi construído para possibilitar a avaliação clínica e microtomográfica do uso de bifosfonatos em ratas, submetidas à extração dentária (molares inferiores esquerdos), quanto à presença ou ausência de osteonecrose.

- Escaneamento inicial (μCT_0) de G1 e G2.
- Administração de ácido zolendrônico nos subgrupos GZ1 e GZ2 e soro fisiológico nos subgrupos GC1 e GC2.
- Finalização da administração da medicação após 3 semanas.
- Escaneamento intermediário (μCT_i), após as três semanas do início da medicação (todos os animais), 5 dias antes da cirurgia.
- Extração dentária de todos os animais, após cinco dias do μCT_i .
- Avaliação clínica da presença ou ausência de osteonecrose e escaneamento final (μCT_f) após seis semanas da cirurgia de todos os animais.

4.1.2. Protocolo de medicação

A montagem dos grupos ocorreu da seguinte forma (**FIGURA 5**):

- Grupo 1 (G1): primeiros 20 animais.

- Subgrupo Zolendronato 1 (GZ1), recebeu Zolendronato 66 µg/kg, via intraperitoneal três vezes por semana, durante três semanas.
- Subgrupo Controle 1 (GC1), recebeu soro fisiológico, via intraperitoneal, três vezes por semana, durante três semanas.
- Grupo 2(G2): 20 animais que chegaram uma semana depois.
 - Subgrupo Zolendronato 2 (GZ2) recebeu Zolendronato 66 µg/kg, via intraperitoneal, três vezes por semana, durante três semanas.
 - Subgrupo Controle 2 (GC2) recebeu soro fisiológico, via intraperitoneal, três vezes por semana, durante três semanas.

O mesmo protocolo de execução foi realizado para os grupos G1 e G2, de forma independente, cada qual seguindo sua cronologia com uma semana de diferença. Para ambos os grupos G1 e G2, o Ácido Zoledrônico utilizado foi do Laboratório Novartis, Suíço, em solução injetável de 4mg/5ml e foi adquirido a partir da loja virtual 4Bio Medicamentos S.A., São Paulo.

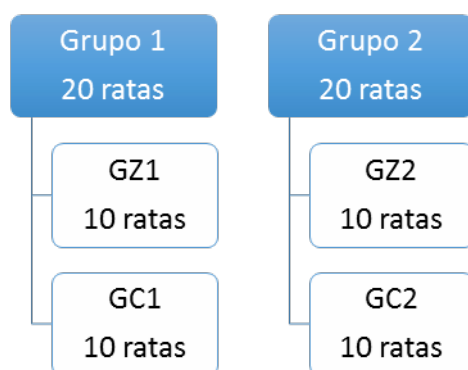


FIGURA 3: Distribuição dos grupos G1 e G2; e em experimentais e controles.

4.2. MICROTOMOGRÁFIA E PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

4.2.1. Microtomografia Inicial

Todos os animais (G1 e G2) foram submetidos ao primeiro escaneamento microtomográfico inicial (μTC_0) no dia zero do experimento, dois dias antes da administração da primeira dose da medicação. Os animais foram anestesiados com Cloridrato de Cetamina 10% e sedados com xilazina 2% (doses de 90 e 15mg/Kg respectivamente) aplicados por via intraperitoneal com agulha hipodérmica 0,38 X 13mm, com seringas de 1ml. Então, para recuperação pós-sedação dos animais, foi dado 48 horas de repouso, recomendado pelo veterinário responsável pela pesquisa (FIGURAS 6 E 7) .

4.2.2. Medicação

A partir do segundo dia do experimento (dia dois) os animais receberam a medicação ou o soro fisiológico, três vezes por semana, por três semanas. Os animais foram observados e pesados três vezes por semana, sempre antes da medicação, para cálculo de dose (**FIGURA 5**).

4.2.3. Microtomografia Intermediária

Após três semanas do início da medicação, os 20 animais do G1, foram submetidos a novo escaneamento microtomográfico intermediário (μTC_i) antes da cirurgia, com o mesmo protocolo de sedação e anestesia descritos, a fim de se observar as alterações causadas pelo Zometa (ácido zolendrônico) na mandíbula antes do trauma.

4.2.4. Extrações dentárias e pós operatório

Então, aguardou-se 5 dias para recuperação dos animais, para que novamente, usando o mesmo protocolo de sedação e anestesia, fossem feitas as extrações do primeiro ou segundo molar inferior do lado esquerdo, após prévio exame clínico para observar presença ou ausência de alguma lesão bucal. Após antisepsia com bolinha de algodão estéril embebida em digluconato de clorexidina à 4% degermante, os dentes (primeiro ou segundo molares esquerdos) foram extraídos por um único operador, porém com ajuda de uma auxiliar tanto para imobilização dos animais durante processo de anestesia/sedação, quanto para afastamento de tecidos moles. Utilizou-se cabos de bisturi e pinça clínica para afastar bochecha e língua. A sindesmotomia das fibras gengivais foi realizada com uso de espátula 7 e a luxação do dente foi feita com espátula 7, na região interdental do primeiro e segundo molares. Por dificuldades técnicas, devido ao tamanho das estruturas bucais dos animais, para posicionar de forma correta a espátula durante a luxação, algumas vezes o dente luxado foi o segundo molar, então, nestes casos, removeu-se o segundo molar ao invés do primeiro. Após a exodontia, foi realizada a síntese dos tecidos gengivais, sutura simples comum, com fio reabsorvível sintético Vicryl[®] 4.0, a fim de se evitar um trauma maior, já que o fio reabsorvível de origem animal causa maior inflamação tecidual local (**FIGURAS 8 E 9**). Após a cirurgia, foi administrado cloridrato de tramadol, solução injetável de 50mg (30mg/kg), a cada 12 horas, nas primeiras 48 horas. Além disso, para maior conforto dos animais, foi misturado dipirona em xarope sabor framboesa 50mg/ml (1 frasco de 100ml para

1 litro de água) e colocado a vontade por 72 horas. Além disso, a alimentação foi alterada, acrescentando frutas secas (uva passa e damasco) para conforto mastigatório no pós-cirúrgico e menor morbidade nas seis semanas após extração.

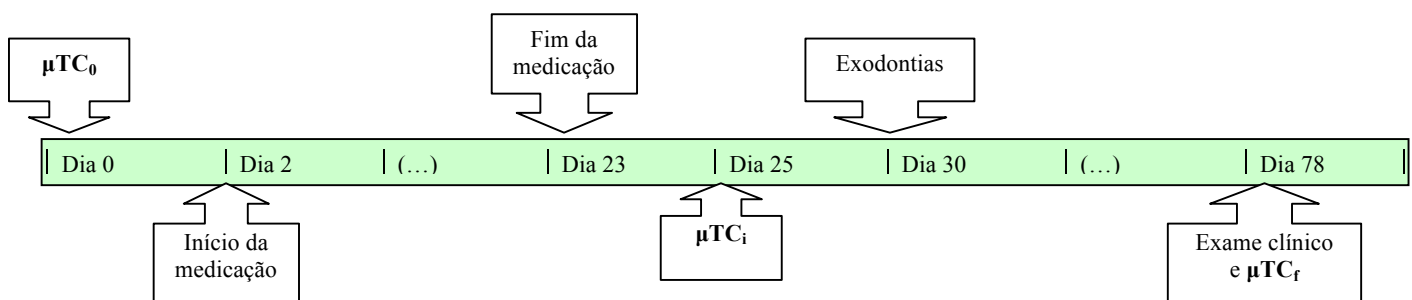
4.3. EVOLUÇÃO PÓS CIRÚRGICA

Os animais foram avaliados duas vezes na semana durante as seis semanas pós cirúrgica, observando-se o comportamento, a capacidade de se alimentar, alteração ou lesão na região bucal externa e peso.

Seis semanas após a realização das extrações, os animais foram sedados e anestesiados novamente e então, foi realizada a microtomografia final (μTC_f).

A avaliação clínica ocorreu dois dias após a μTC_f , logo após eutanásia e decapitação, examinando e fotografando as ratas em dois momentos seguidos, antes e depois de dissecação da pele e subcutâneo do animal. A cavidade bucal foi examinada total e observada presença de lesão e osso exposto em toda cavidade e na região da extração. Foi realizada por uma única pessoa, por meio de observação direta, em sala clara e apropriada para inspeção. A cabeça do animal decapitado foi posicionada, em primeiro momento, e os lábios e mucosa jugal foram afastados com auxílio de cabo de bisturi e pinça, e então uma minuciosa inspeção foi conduzida quanto à presença ou ausência de cicatrização de tecidos moles, exposição óssea, de forma espontânea ou não, na região onde houve o trauma cirúrgico. Os critérios para a avaliação clínica foram a presença ou ausência de cicatrização de tecidos moles, exposição óssea, secreção purulenta e fístula intra e/ou extrabucal. A inspeção e a fotografia foram realizadas respectivamente. E então, em um segundo momento, foi realizada a dissecação de pele e subcutâneo da cabeça dos animais por outra operadora, que fará o estudo histológico dos animais. Então, uma nova inspeção e fotografias para confirmação de dados, foram realizadas. Os achados clínicos foram registrados em ficha própria (**FIGURA 5: E**) e as imagens estão documentadas nos resultados.

FIGURA 4: *Timeline do experimento*



4.4. ESCANEAMENTO POR MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA

Foi utilizado o aparelho de μ TC *in vivo* SkyScan 1076 (Bruker) para a realização da μ TC, localizado no Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

A μ TC foi realizada com tamanho de voxel isotrópico de 18 x 18 x 18 μ m e um tempo de escaneamento por rata de aproximadamente de 37 minutos. As reconstruções bidimensionais foram realizadas com o *software* NRecon (V 1.6.9, versão 64 bit com aceleração GPU, Bruker) e as tridimensionais com os *softwares* CTvox (V 1.5.0, versão 64 bit, Bruker) e CTvol (V 2.2, versão 64 bit, Skyscan, Kontich, Bélgica).

O escaneamento foi realizado por um único operador, no Instituto de Biologia (IB) da UnB, sob supervisão do Professor Sasha Braum.

4.4.1. ANÁLISE DAS IMAGENS MICROTOMOGRÁFICAS

As imagens foram analisadas nos *softwares* Dataviewer (V 1.5.0, versão 64 bit, Bruker) e CTAn (V 1.13, versão 64 bit, Bruker) por dois radiologistas experientes com o conhecimento das análises clínicas, em ambiente apropriado e com controle da luminosidade. O equipamento para visualização das imagens foi o monitor Dell UltraSharp™ U2410, 24 polegadas, HAS Wide, VGA/ DVI/ DP/ HDMI.

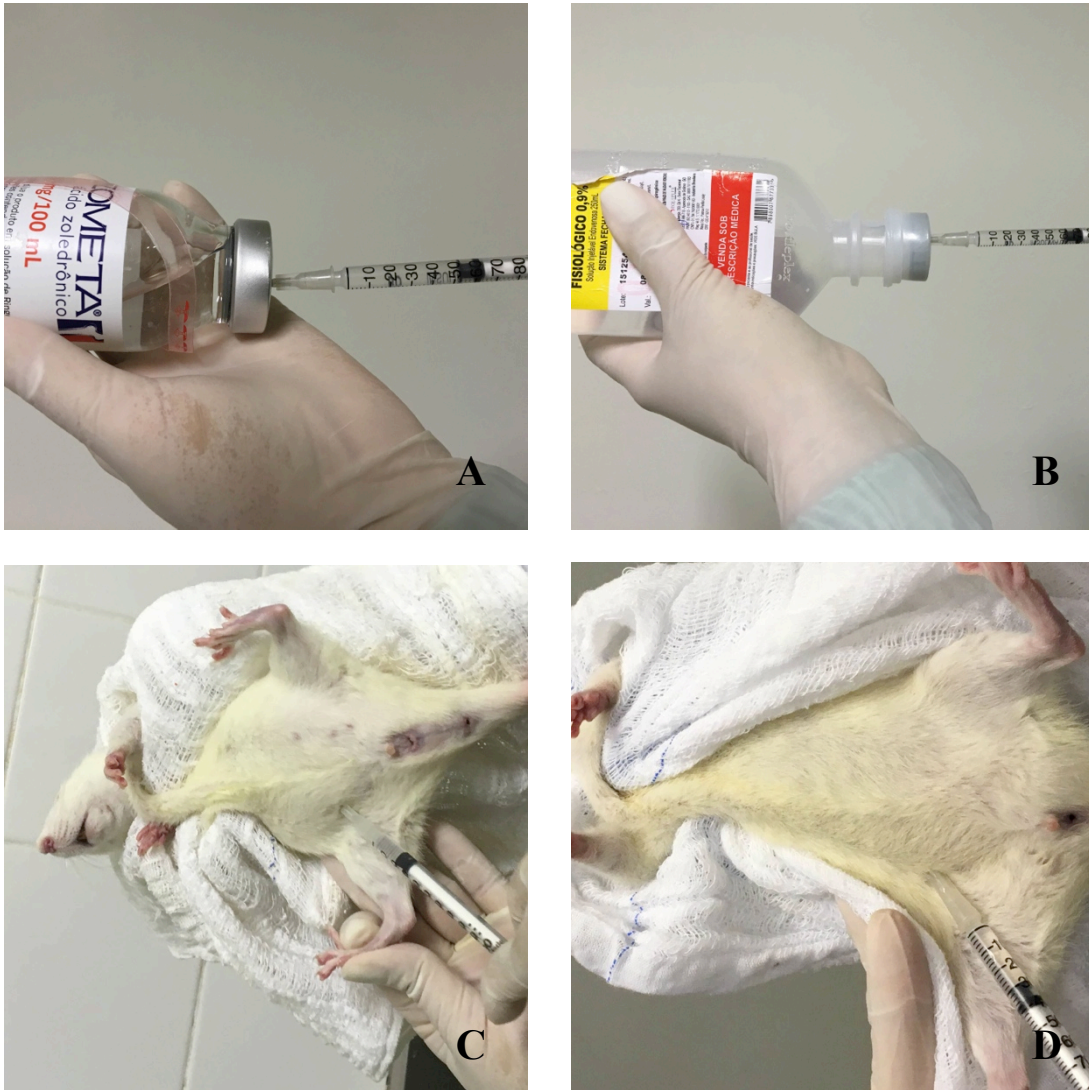
Os exames foram avaliados qualitativamente, quanto à presença ou ausência de cortical íntegra, reação periosteal (bicorticalização), sequestro ósseo e tamanho da lesão, em milímetro, em sua maior altura avaliando os cortes microtomográficos. E quantitativamente, a partir da determinação de uma área de interesse (ROI), com dimensão em formato circular de 832,8 μ m (Altura e largura), número 46, localizado e limitado na região abaixo dos periápices das raízes do primeiro molar inferior esquerdo e acima do incisivo inferior esquerdo; e lateralmente, entre a cortical lingual (medial) e o canal mandibular (**FIGURA 7D**). Em três dimensões, o formato do ROI, formaria uma imagem aproximada a um cilindro. Na área de interesse, foi calculado a densidade mineral óssea (DMO), a espessura trabecular óssea (Tb.Th), o número trabecular (Tb.N), a separação trabecular (Tb.Sp) e a dimensão fractal (FD).

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, foram apresentados os dados referentes às avaliações qualitativas clínicas (presença de cicatrização, abscesso/fístula e exposição óssea), bem como os dados referentes às seguintes avaliações qualitativas microtomográficas: cortical íntegra, reação periosteal, sequestro ósseo e presença de lesão. Para todas essas variáveis clínicas e microtomográficas foram apresentadas as frequências absolutas e relativas percentuais. As frequências foram comparadas entre os grupos “controle” e “zolendronato” (Z) por meio do teste de qui-quadrado para k proporções.

A análise descritiva da amostra foi realizada por meio do cálculo de médias e desvios-padrão para os seguintes parâmetros ósseos analisados na microtomografia computadorizada (variáveis quantitativas): Densidade Mineral Óssea (DMO), Espessura das trabéculas (Tb.Th), Número de trabécula (Tb.N), Espaçamento entre as trabéculas ósseas (Tb.Sp) e Dimensão fractal do trabeculado ósseo (DF). Todas essas variáveis foram avaliadas em função dos grupos experimentais “controle” e “zolendronato (Z)” ao longo de três tempos distintos: T0 – momento inicial; T1 – após a administração do zolendronato; T2 – após a extração do lado esquerdo. Além disso, as variáveis foram analisadas nos lados direito e esquerdo.

Uma vez que a experimentação foi realizada em um delineamento inteiramente casualizado, os dados foram avaliados por testes paramétricos. Foi aplicada a Análise de Variância Fatorial (ANOVA-fatorial) para medidas repetidas, testando a hipótese nula de igualdade de médias entre os grupos experimentais ao longo dos três momentos de análise microtomográfica. Esta análise foi seguida do teste de acompanhamento de LSD-Fisher em caso de significância estatística ($p < 0,05$). Em todas as análises foi utilizado um nível de significância de 0,05. As análises foram realizadas nos programas Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., 2004. STATISTICA - data analysis software system, version 7. www.statsoft.com).



Pesquisa Mestrado

Tabela de Cálculo de Dose de Zometa/Soro Fisiológico

Grupo 1		Zometa		17/06/16		20/06/16		24/06/16		27/06/16		29/06/16		01/07/16		04/07/16		06/07/16	
Subgrupo	Rat	Peso	Dose	Peso	Dose	Peso	Dose	Peso	Dose	Peso	Dose	Peso	Dose	Peso	Dose	Peso	Dose	Peso	Dose
6	A	1	265	0,43725	260	0,429	280	0,462	284	0,4686	285	0,47025	290	0,4785	292	0,4818	0,00165	0,00165	0,00165
7	A	2	327	0,53955	324	0,5346	342	0,5643	348	0,5742	360	0,594	367	0,60555	367	0,60555	0,00165	0,00165	0,00165
8	A	3	233	0,38445	230	0,3795	246	0,4092	242	0,3993	249	0,41085	260	0,429	265	0,43725	0,00165	0,00165	0,00165
9	A	4	237	0,39105	234	0,3861	252	0,4158	253	0,41745	253	0,41745	271	0,44715	272	0,4488	0,00165	0,00165	0,00165
10	B	1	276	0,4554	280	0,462	291	0,48015	318	0,5247	321	0,52965	337	0,55605	343	0,56595	0,00165	0,00165	0,00165
11	B	2	262	0,4323	260	0,429	277	0,45705	266	0,4389	273	0,45045	271	0,44715	282	0,4653	0,00165	0,00165	0,00165
12	B	3	246	0,4059	242	0,3993	261	0,43065	254	0,4191	255	0,42075	261	0,43065	265	0,43725	0,00165	0,00165	0,00165
13	C	1	295	0,48675	297	0,49005	310	0,5115	322	0,5313	330	0,5445	340	0,561	345	0,56925	0,00165	0,00165	0,00165
14	C	2	260	0,429	260	0,429	275	0,45375	284	0,4686	292	0,4818	298	0,4917	305	0,50325	0,00165	0,00165	0,00165
15	C	3	245	0,40425	242	0,3993	260	0,429	260	0,429	267	0,44055	273	0,45045	280	0,462	0,00165	0,00165	0,00165
Controle				22/06/16		24/06/16		27/06/16		29/06/16		01/07/16		04/07/16		06/07/16			
17	A	1	257	0,42405	254	0,4191	269	0,44385	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165
18	A	2	183	0,30195	190	0,3135	198	0,3267	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165
19	A	3	225	0,37125	219	0,36135	240	0,396	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165
20	A	4	298	0,4962	290	0,4795	319	0,52965	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165	0,00165
21	B	1	267	0,44055	260	0,429	282	0,4653	280	0,462	286	0,4719	287	0,47355	303	0,49995	0,00165	0,00165	0,00165
22	B	2	200	0,33	199	0,32835	215	0,35475	231	0,38115	285	0,47025	251	0,41415	269	0,44385	0,00165	0,00165	0,00165
23	B	3	260	0,429	245	0,40425	275	0,45375	260	0,429	269	0,44385	272	0,4488	283	0,46695	0,00165	0,00165	0,00165
24	B	4	272	0,4488	280	0,462	287	0,47355	306	0,5049	319	0,52635	326	0,5379	329	0,54285	0,00165	0,00165	0,00165
25	C	1	272	0,4488	280	0,462	287	0,47355	306	0,5049	319	0,52635	326	0,5379	329	0,54285	0,00165	0,00165	0,00165
26	C	2	288	0,4752	286	0,4719	303	0,49995	318	0,5247	321	0,52965	329	0,54285	338	0,5577	0,00165	0,00165	0,00165
27	C	3	272	0,4488	277	0,45705	287	0,47355	298	0,4917	311	0,53135	322	0,5333	327	0,53955	0,00165	0,00165	0,00165
Grupo 2				22/06/16		24/06/16		27/06/16		29/06/16		01/07/16		04/07/16		06/07/16		08/07/16	
29	A	1	212	0,3498	227	0,37455	229	0,37785	245	0,40425	249	0,41085	259	0,42735	259	0,42735	270	0,4455	272
30	A	2	239	0,39435	254	0,4191	266	0,4389	275	0,45375	285	0,47025	300	0,495	312	0,5148	320	0,528	322
31	A	3	233	0,38445	248	0,4092	254	0,4191	264	0,4356	269	0,44385	275	0,45375	285	0,47025	288	0,48	288
32	A	4	272	0,4488	287	0,47355	295	0,48675	308	0,5082	312	0,5148	323	0,5295	336	0,5544	345	0,56925	340
33	B	1	243	0,40995	258	0,4257	272	0,4488	285	0,47025	291	0,48015	302	0,4983	306	0,5049	311	0,51315	312
34	B	2	226	0,3729	241	0,39765	252	0,4158	266	0,4389	275	0,45375	280	0,462	285	0,47025	298	0,4917	292
35	B	3	233	0,38445	248	0,4092	254	0,4191	264	0,4356	269	0,44385	275	0,45375	285	0,47025	288	0,48	288
36	B	4	272	0,4488	287	0,47355	295	0,48675	308	0,5082	312	0,5148	323	0,5295	336	0,5544	345	0,56925	340
37	C	1	210	0,3495	225	0,37125	229	0,38115	240	0,396	256	0,4124	260	0,429	267	0,44055	275	0,45375	276
38	C	2	210	0,3495	225	0,37125	229	0,38115	240	0,396	256	0,4124	260	0,429	267	0,44055	275	0,45375	276
39	C	3	184	0,3036	199	0,32835	213	0,35145	223	0,36795	233	0,38445	246	0,4059	251	0,41415	264	0,4356	265

FIGURA 5: 5A e 5B, medicações: Zometa® e soro fisiológico, respectivamente. 5C e 5D, via de administração intraperitoneal de ambas as medicações. 5E, tabela criada no aplicativo Microsoft Excel® para cálculo da dosagem a partir da massa corpórea do animal.



FIGURA 6: 6A, aparelho de μ TC Skyscan[®] utilizado. 6B e 6C, preparo das medicações Cetamin[®] e Xilazin[®], e injeção via intramuscular, metade da dose em cada coxa do animal, respectivamente. 6D, animal sedado. 6E, identificação do animal com caneta permanente vermelha.

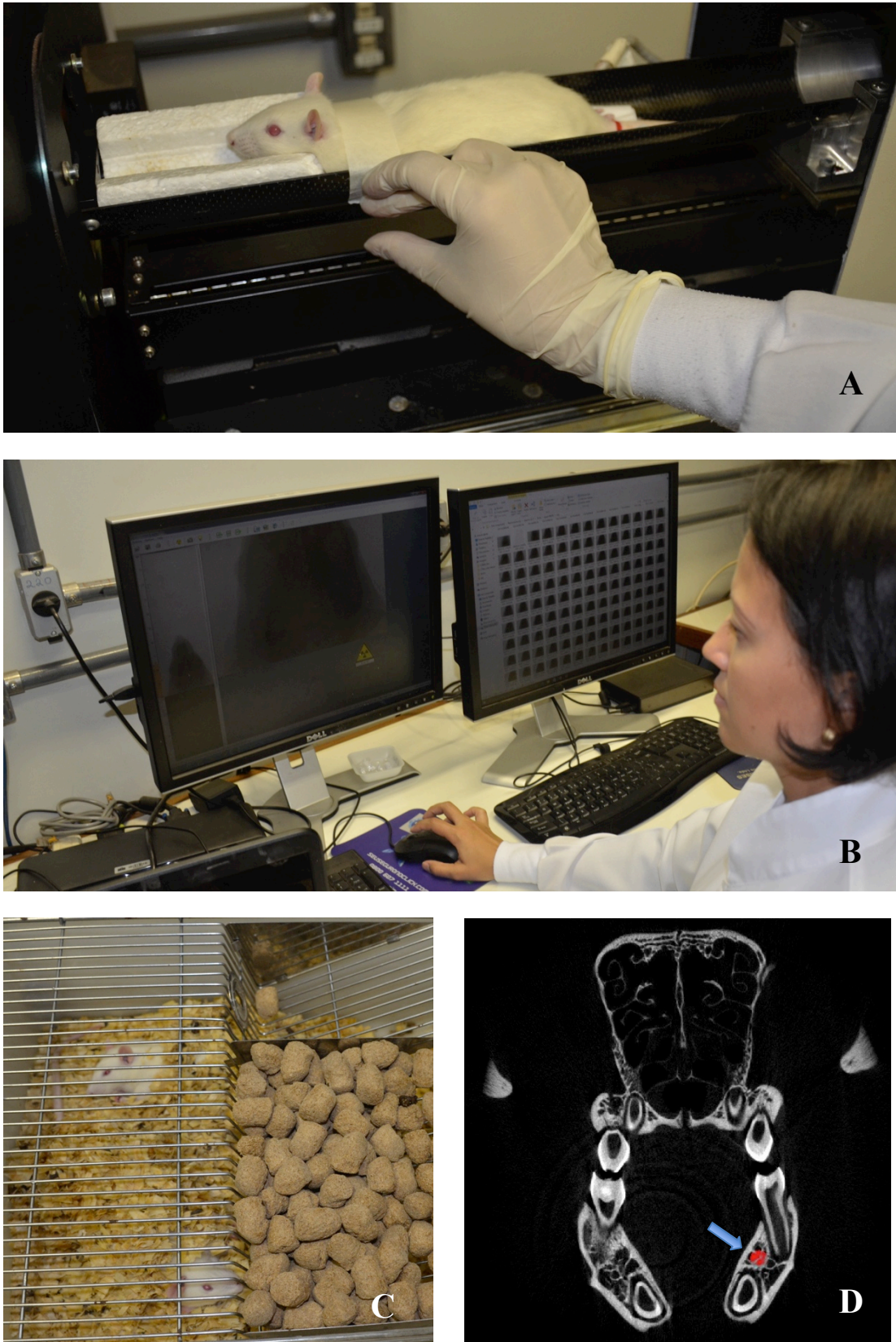


FIGURA 7: 7A, posicionamento do animal, em posição decúbito ventral no leito do aparelho de μ TC e estabilização da cabeça do animal com fita branca. 7B, início do escaneamento da cabeça do animal. 7C, recuperação pós-anestésica das ratas. 7D, seta azul mostrando o ROI (círculo vermelho).

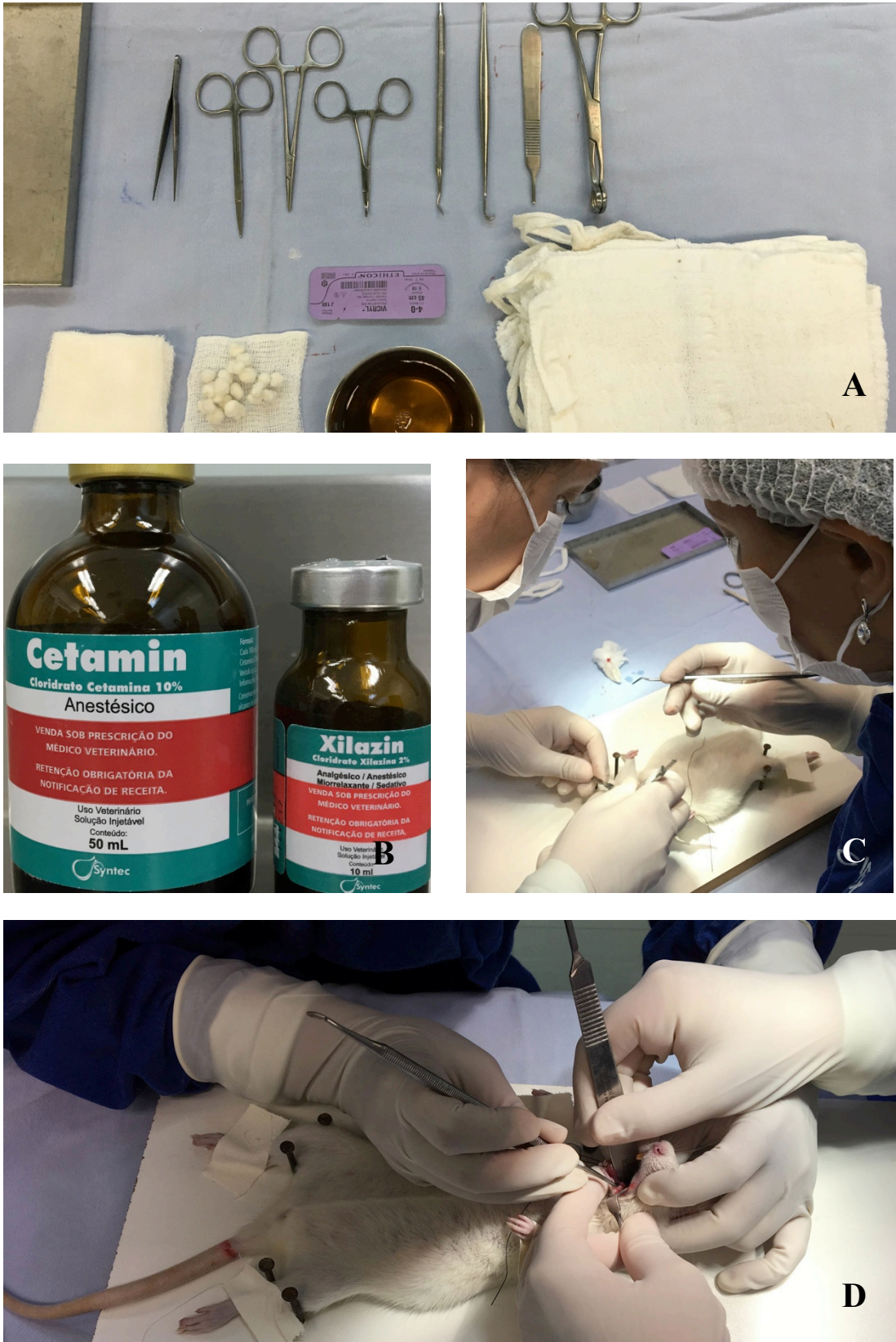


FIGURA 8: **8A**, mesa cirúrgica montada com instrumentais, gazes, bolinhas de algodão, clorexidina, fio de sutura Vicryl® e compressas. **8B**, anestésico (Cloridrato de quetamina 10%) e sedativo (Cloridrato de xilazina 2%) usados. **8C**, início do procedimento cirúrgico com sindesmotomia dos tecidos gengivais que envolvem o dente. **8D**, luxação do primeiro molar inferior esquerdo.

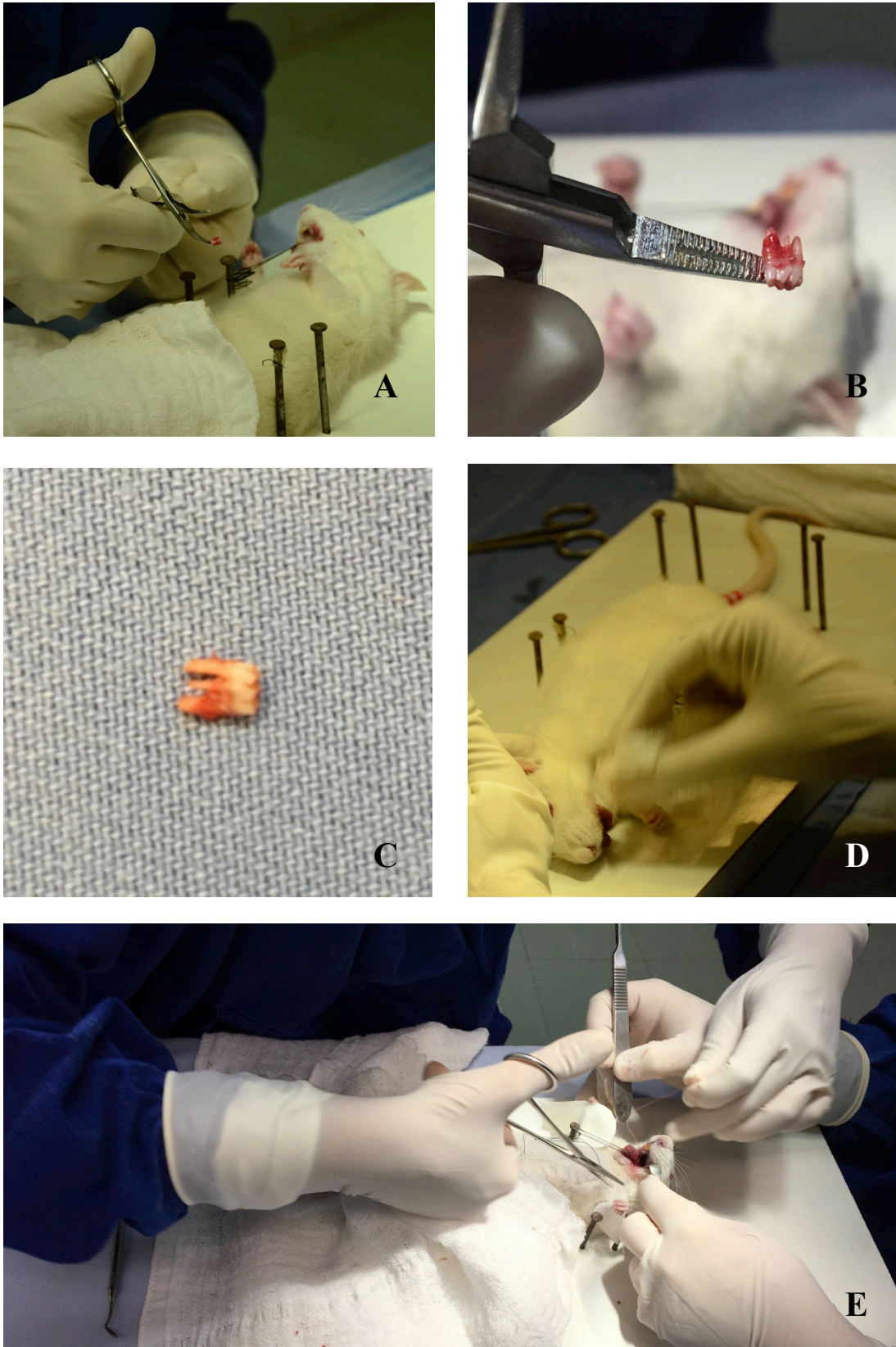


FIGURA 9: 9A, 9B e 9C, extração do primeiro molar inferior esquerdo. 9D, posicionamento do animal em posição decúbito lateral para recuperação de apneia durante procedimento cirúrgico em vários momentos da cirurgia. 9E, síntese dos tecidos usando fio de sutura Vicryl®

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

O presente estudo objetivou a indução de osteonecrose por uso de bifosfonato e extração dentária na região hemimandibular esquerda.

5.1. PERDAS DE AMOSTRA

Houve oito perdas de animais (20% da amostra) durante o experimento. Seis dos Subgrupos Controles (30%) e dois, Zometas (10%).

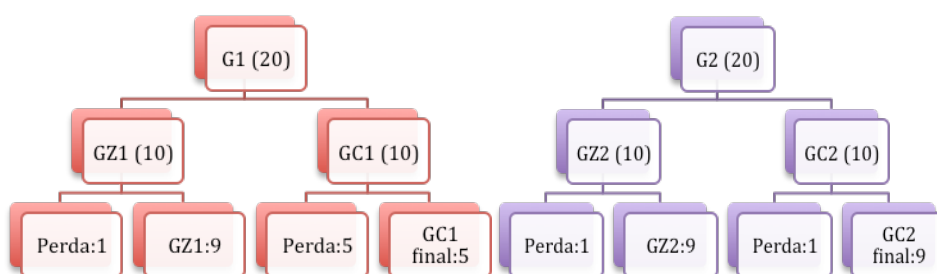


Figura 10: Imagem esquemática da distribuição das perdas por cada subgrupo.

5.1.1. MOTIVOS DAS PERDAS

Perda do GZ1: morte durante transcirúrgico*;

Perdas do GC1: Uma rata morreu durante transcirúrgico*; e quatro ratas por confusão com a medicação (foi injetado zometa ao invés de soro fisiológico nos quatro animais).

Perda do GZ2: morte durante transcirúrgico*.

Perda do GC2: morte após ser anestesiada e colocada dentro do microtomógrafo para o escaneamento inicial. Autópsia realizada pelos veterinários revelaram congestão (presença de líquido) em alguns órgãos, como fígado e baço, característico de choque anafilático.

*Tiveram 3 perdas durante o transcirúrgico e vários outros animais tiveram apnéias longas e paradas cardiorrespiratórias, tendo sido necessário a reanimação deles com massagem compressiva na região torácica. Os veterinários relataram que a sedação gera dificuldade respiratória e que o animal, pelo fato de ter que permanecer em posição supina durante as exodontias, associado à manipulação da língua com afastadores, gerou uma grande dificuldade respiratória, por este motivo tiveram tantas intercorrências transcirúrgicas.

5.2. ANÁLISE CLÍNICA DA AMOSTRA

A análise quantitativa clínica foi realizada a partir da pesagem de massa corpórea das ratas, duas vezes na semana, durante todo o tempo experimental até o dia do escaneamento

final. Enquanto a qualitativa, a partir de exame clínico antes de todas as três tomadas microtomográficas, sempre após sedação, em sala clara, com uso de afastadores e foco de luz artificial. A análise clínica final, foi confirmada com exame clínico após eutanásia, dois dias após o escaneamento final, em dois momentos distintos, antes e após dissecação dos tecidos mandibulares, em que foi possível confirmar melhor presença ou ausência de cicatrização de tecidos moles, exposição óssea, fístula e/ou abscesso intra ou extrabucal.

Não houve alteração clínica bucal (ratas tratadas ou controle) nos exames clínicos realizados com uso de afastadores após sedação e imediatamente antes os escaneamentos T₀ e T₁. Nenhum dos animais desenvolveram manifestações clínicas clássicas de MRONJ tais como, exposição óssea espontânea, abscesso e fístula antes da extração dentária antes de T₂.

Como os grupos 1 e 2, foram realizados, embora independentes em sua cronologia, porém seguindo o mesmo protocolo metodológico, e tendo obtido resultados qualitativos semelhantes, foi realizado a união dos grupos GZ1 e GZ2, que serão agora o grupo tratado com zolendronato, e a união dos grupos GC1 e GC2, os quais serão o grupo controle. Estas uniões ocorrem a fim de obter uma análise estatística mais objetiva.

5.2.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

A **tabela 1** apresenta a comparação das frequências das características clínicas observadas entre o grupo tratado com zolendronato e o grupo controle. Nota-se que o processo de cicatrização normal após a exodontia ocorreu em todos os animais do grupo controle. No entanto, apenas 4 dos 18 animais do grupo tratado com zolendronato apresentaram cicatrização normal. A exposição óssea, que caracteriza a osteonecrose ocorreu com frequência bem maior nos animais tratados com zolendronato (78%), enquanto que nenhum dos animais do grupo controle apresentou essa alteração após a extração dentária.

Tabela 1. Frequências absoluta e relativa percental das características clínicas observadas em relação aos grupos controle e tratado com zolendronato.

	Controle		Tratado		p-valor
	n	%	n	%	
Cicatrização	14	100%	4	22%	<0,0001*
Exposição óssea	0	0%	14	78%	<0,0001*
Abcesso/fistula	0	0%	3	17%	0,109

*p<0,05, teste do qui-quadrado para k proporções.

5.2.2. Características microtomográficas

Nenhum dos animais (controle ou tratado) apresentou lesão periapical, reação periosteal ou sequestro ósseo em T₀ e T₁ nas análises microtomográficas.

A tabela 2 apresenta reação periosteal e sequestros ósseos em T₂. Não houve diferença significativa na frequência de lesões periapicais entre os animais do grupo controle e os animais do grupo tratado.

Tabela 2. Frequências absoluta e relativa percental das características microtomográficas observadas em relação aos grupos controle e tratado com zolendronato.

	Controle		Tratado		p-valor
	n	%	n	%	
Cortical íntegra	13	93%	11	61%	0,040*
Reação periosteal	0	0%	14	78%	<0,0001*
Sequestro ósseo	0	0%	5	28%	0,032*
Presença de lesão	4	29%	10	56%	0,127

*p<0,05, teste do qui-quadrado para k proporções.

A **Figura 11** sintetiza as frequências relativas percentuais da ocorrência das características clínicas e microtomográficas entre os grupos controle e o grupo tratado com zolendronato.

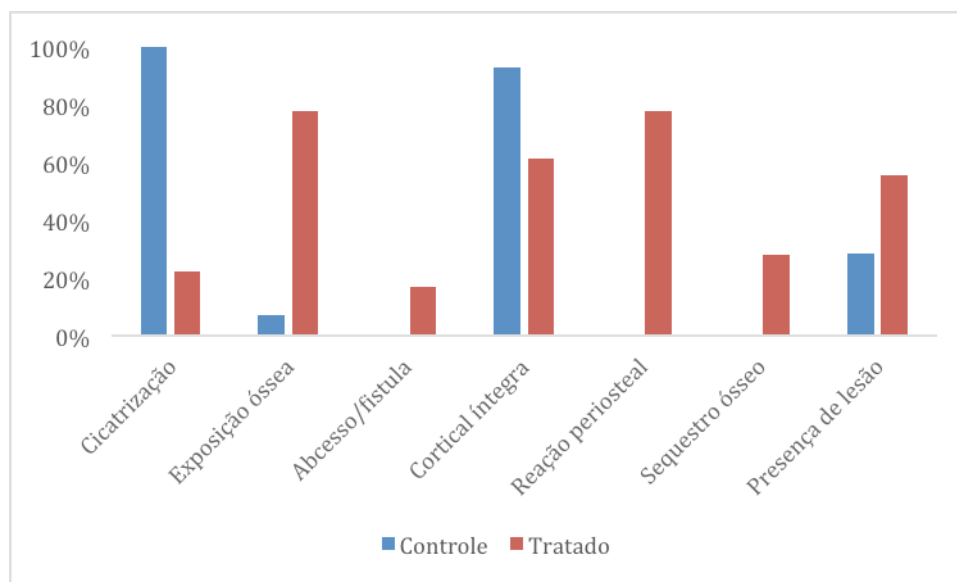


Figura 11. Frequências relativas percentuais da ocorrência de características nos grupos Controle e Tratado.

5.3. ANÁLISE QUANTITATIVA DA AMOSTRA

5.3.1. Parâmetros ósseos microtomográficos

A **tabela 3** apresenta os dados referentes aos parâmetros ósseos quantitativos analisados nos exames microtomográficos. Nesta tabela, são apresentados os dados descritivos (média e desvios-padrão) de todos os parâmetros ósseos, nos dois grupos experimentais (controle e tratado com zolendronato), nos lados direito e esquerdo avaliados, e nos três momentos de avaliação microtomográfica (T0: avaliação inicial, T1: após a medicação; T2: após as extrações). Foram avaliados os parâmetros de densidade mineral óssea (DMO), espessura das trabéculas (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N), espaçamento entre as trabéculas (Tb.Sp) e dimensão fractal (DF).

Tabela 3 – Médias e Desvios Padrão de variáveis analisadas em função dos grupos ao longo dos três momentos de experimentação.

Variáveis	Grupo	Lado	T0		T1		T2	
			Média	DP	Média	DP	Média	DP
DMO	Controle	Direito	0,360	0,004	0,361	0,005	0,353	0,003
		Esquerdo	0,355	0,021	0,361	0,005	0,353	0,003
	Tratado	Direito	0,359	0,007	0,355	0,004	0,358	0,003
		Esquerdo	0,359	0,007	0,355	0,004	0,358	0,003
Tb.Th	Controle	Direito	86,524	6,326	83,488	8,727	78,642	10,191
		Esquerdo	87,150	5,122	82,173	4,884	76,516	11,692
	Tratado	Direito	87,599	9,950	78,233	7,908	81,187	15,924
		Esquerdo	85,016	7,475	80,476	10,651	74,492	15,396
Tb.N	Controle	Direito	0,003	0,001	0,002	0,001	0,002	0,001
		Esquerdo	0,004	0,000	0,003	0,001	0,001	0,001
	Tratado	Direito	0,004	0,001	0,002	0,000	0,001	0,001
		Esquerdo	0,004	0,001	0,002	0,000	0,001	0,001
Tb.Sp	Controle	Direito	187,208	29,901	261,990	60,750	320,499	55,377
		Esquerdo	157,717	18,301	235,123	43,296	359,531	58,728
	Tratado	Direito	173,714	25,053	288,846	39,677	370,776	89,931
		Esquerdo	158,659	22,330	258,766	44,779	412,125	110,446
DF	Controle	Direito	2,044	0,052	1,882	0,115	1,736	0,140
		Esquerdo	2,062	0,037	1,923	0,079	1,685	0,167
	Tratado	Direito	2,046	0,058	1,821	0,070	1,655	0,212
		Esquerdo	2,078	0,051	1,893	0,083	1,544	0,249

T0 = microtomografia em tempo inicial, T1 = momento da segunda microtomografia após a administração do zolendronato, T2 = momento da terceira microtomografia após a extração, TbTH = espessura das trabéculas, Tb.N = número de trabéculas ósseas, TBSP = espaçamento entre as trabéculas, DF = análise da dimensão fractal do trabeculado ósseo.

Tabela 4: Tabela resumo interpretativa da **tabela 3**. As setas representam redução (vermelho) ou decréscimo (verde) da médias dos parâmetros ósseos em função do tempo, em ambos os grupos.

	Densidade Mineral Óssea (DMO)					
	Dia 0		Dia 25		Dia 78	
	T0		T1		T2	
	E	D	E	D	E	D
ZOLENDRONATO			↓	↓	↑	↑
CONTROLE			↑	↑	↓	↓
	Dimensão Fractal (DF)					
	T0		T1		T2	
	E	D	E	D	E	D
ZOLENDRONATO			↓	↓	↓	↓
CONTROLE			↓	↓	↓	↓
	Espessura das trabéculas					
	T0		T1		T2	
	E	D	E	D	E	D
ZOLENDRONATO			↓	↓	↓	↑
CONTROLE			↓	↓	↓	↓
	Número de trabéculas (Tb.N)					
	T0		T1		T2	
	E	D	E	D	E	D
ZOLENDRONATO			↓	↓	↓	↓
CONTROLE			↓	↓	↓	↓
	Espaçamento entre as trabéculas (Tb.Sp))					
	T0		T1		T2	
	E	D	E	D	E	D
ZOLENDRONATO			↑	↑	↑	↑
CONTROLE			↑	↑	↑	↑

Em relação à densidade mineral óssea (DMO), medida em pixel/ μm^2 , sendo uma média percentual dentro do ROI, entre os cortes selecionados, foi possível observar que, pela interação dos fatores analisados (grupo experimental e análises das microtomografias em três tempos distintos), não houve diferenças estatisticamente significativas ($F_{2,120} = 0,62; p = 0,542$). Contudo, ao avaliar os fatores isoladamente, foi possível observar que do lado direito e do lado esquerdo, no segundo exame microtomográfico (T1), houve diferença significativa entre os grupos, sendo que as médias do grupo tratado com zolendronato foram menores que as médias do grupo controle ($p < 0,05$; **figura 12**). As demais comparações em cada um dos tempos de análise microtomográfica demonstraram equivalência entre as médias dos grupos ($p > 0,05$).

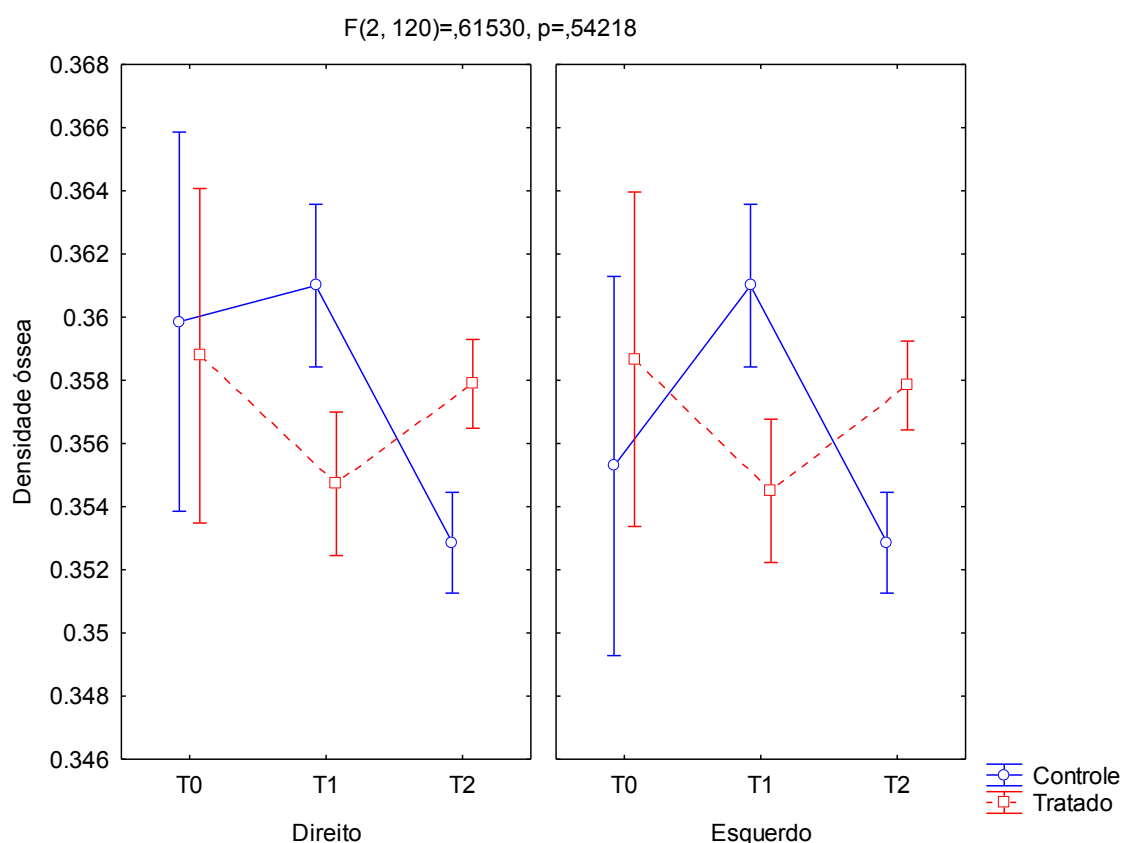


Figura 12. Médias e intervalos de confiança (95%) da densidade mineral óssea em relação aos grupos experimentais (Controle, Tratado), ao longo dos tempos de experimentação (T0, T1 e T2), do lado direito e esquerdo das avaliações.

Em relação à espessura das trabéculas, medida em μm , quando analisada a interação de todos os fatores (grupos tratado e controle, lados direito e esquerdo e tempos distintos de análise microtomográfica), não houve diferenças estatisticamente significativas ($F_{2,120} = 0,74; p = 0,475$). Na avaliação ao longo dos três tempos distintos de análise nas imagens,

também não foi verificada diferença estatística entre os grupos, em ambos os lados avaliados. Contudo, dos lados direito e esquerdo, foi possível verificar que a média da espessura das trabéculas em T2 apresentou redução no grupo controle quando comparado ao T0. No grupo tratado, o lado esquerdo também apresentou o mesmo comportamento, havendo redução da média em T2 quando comparado ao T0 ($p < 0,05$). Já no lado direito, houve redução significativa da média em T1, quando comparado ao T0, porém elevação em T2, apresentando média similar à T0 e T1 ($p > 0,05$, **Figura 13**).

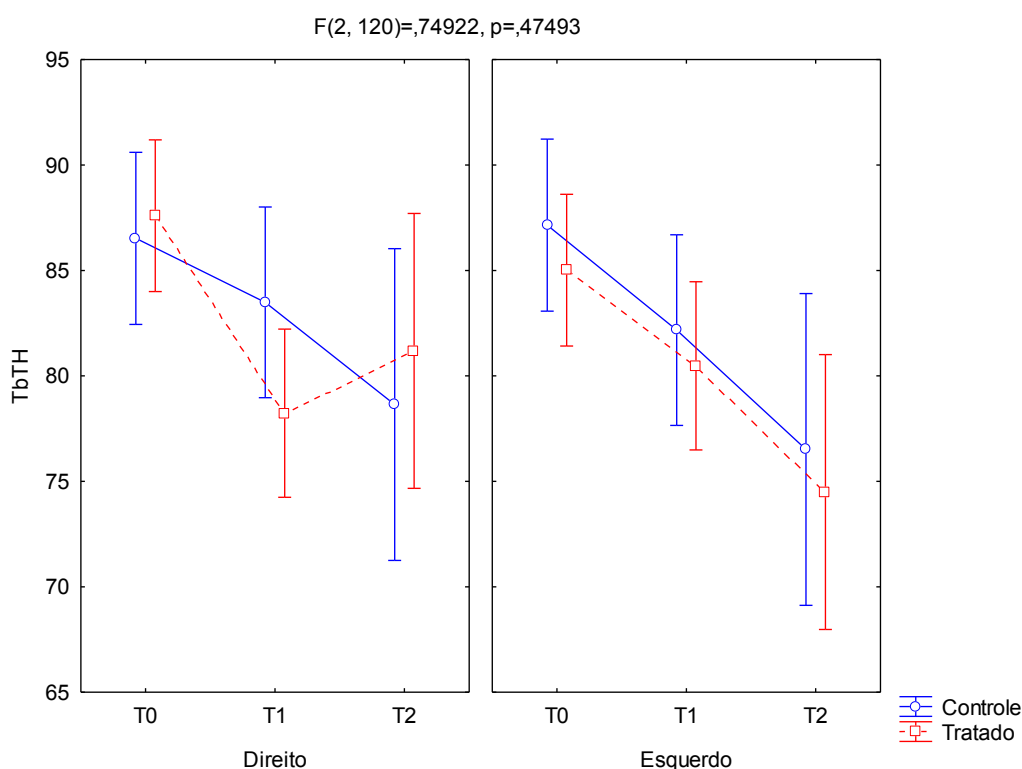


Figura 13 – Médias e intervalos de confiança (95%) da espessura das trabéculas (TbTH) em relação aos grupos experimentais (Controle, Tratado), ao longo dos tempos de experimentação (T0, T1 e T2), do lado direito e esquerdo das avaliações.

O número de trabéculas ósseas, medido em μm , também não foi estatisticamente diferente quando analisados conjuntamente os grupos experimentais, os lados direito e esquerdo e os tempos de avaliação microtomográfica T0, T1 e T2 ($F_{2,120} = 0,44; p = 0,642$). Entre os grupos e entre os lados não houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Porém, houve redução significativa no número médio de trabéculas ao longo dos três tempos de análise microtomográfica ($p < 0,05$) em ambos os grupos e em ambos os lados de avaliação (Figura abaixo).

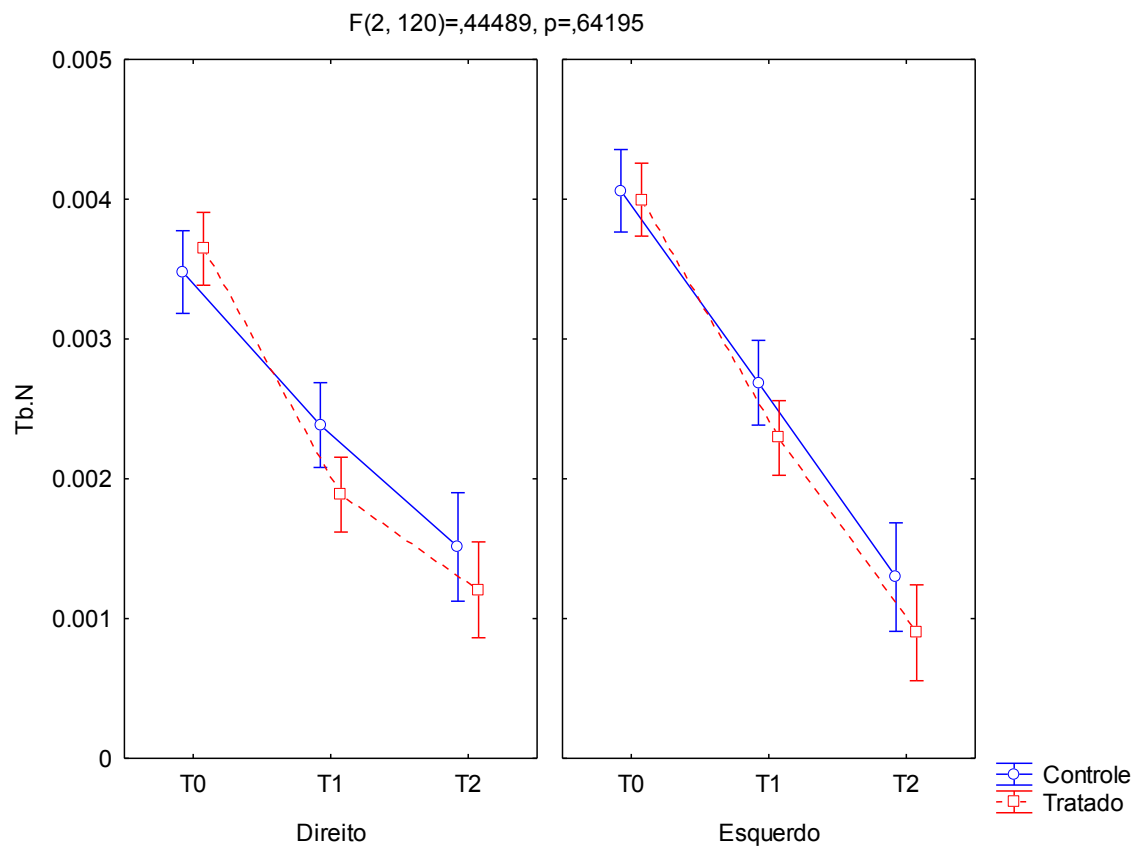


Figura 14 . Médias e intervalos de confiança (95%) do número das trabéculas ósseas (Tb.N) em relação aos grupos experimentais (Controle, Tratado), ao longo dos tempos de experimentação (T0, T1 e T2), do lado direito e esquerdo das avaliações.

Quanto ao espaçamento entre as trabéculas, medida em μm , não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quando analisados todos os fatores conjuntamente ($F_{2,120} = 0,128; p = 0,880$). Todavia, houve elevação significativa do espaçamento entre as trabéculas ao longo dos três tempos de análise, em ambos os lados avaliados, porém o grupo tratado com zolendronato apresentou médias significativamente maiores que o grupo controle no T2 ($p < 0,05$, **Figura 15**).

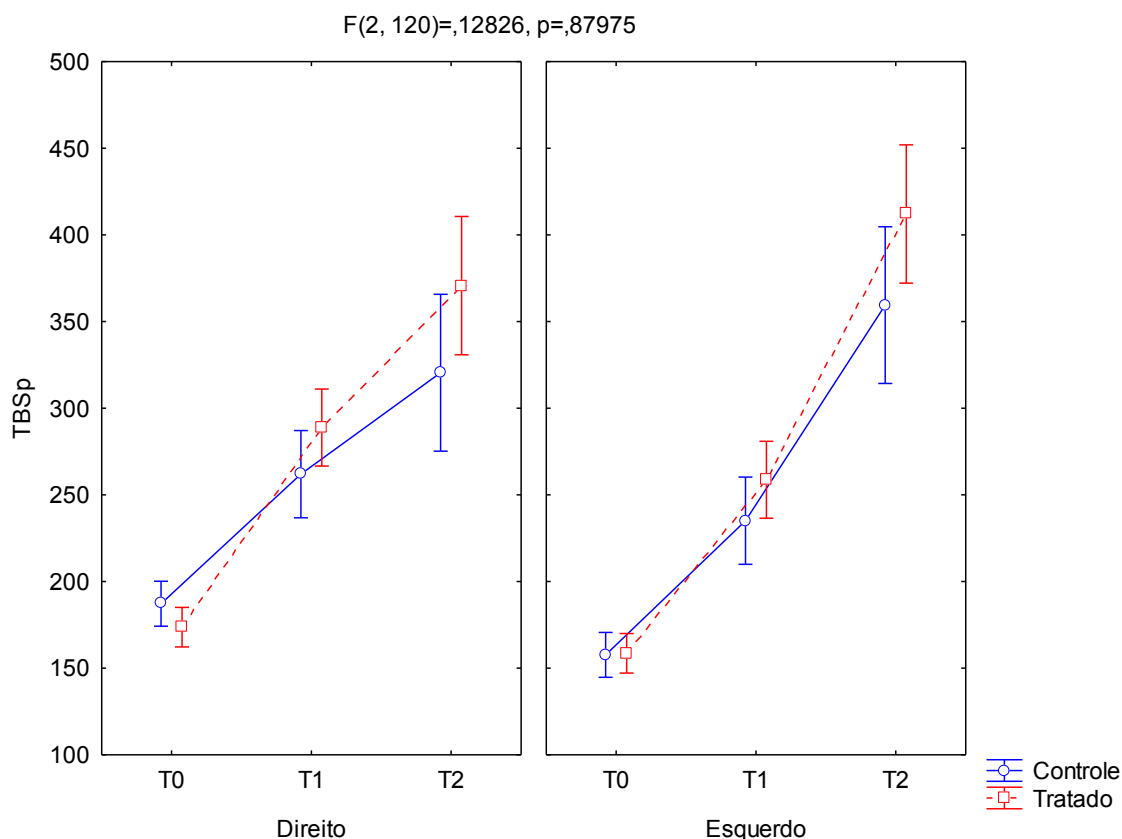


Figura 15 . Médias e intervalos de confiança (95%) do espaçamento das trabéculas ósseas (TBSp) em relação aos grupos experimentais (Controle, Tratado), ao longo dos tempos de experimentação (T0, T1 e T2), do lado direito e esquerdo das avaliações.

Ao avaliar a dimensão fractal, assim como para os demais parâmetros ósseos microtomográficos, a diferença não foi significativa pela interação dos fatores grupos experimentais, lados direito e esquerdo e tempos de análise microtomográfica ($F_{2,120} = 0,658; p = 0,520$). Houve redução significativa das médias de DF ao longo dos tempos T0, T1 e T2, em ambos os lados de avaliação, contudo no grupo tratado, as médias foram significativamente menores no lado esquerdo (onde ocorreram as extrações) que no grupo controle, quando avaliados no momento T2 (após as exodontias), com $p < 0,05$ (**Figura 16**).

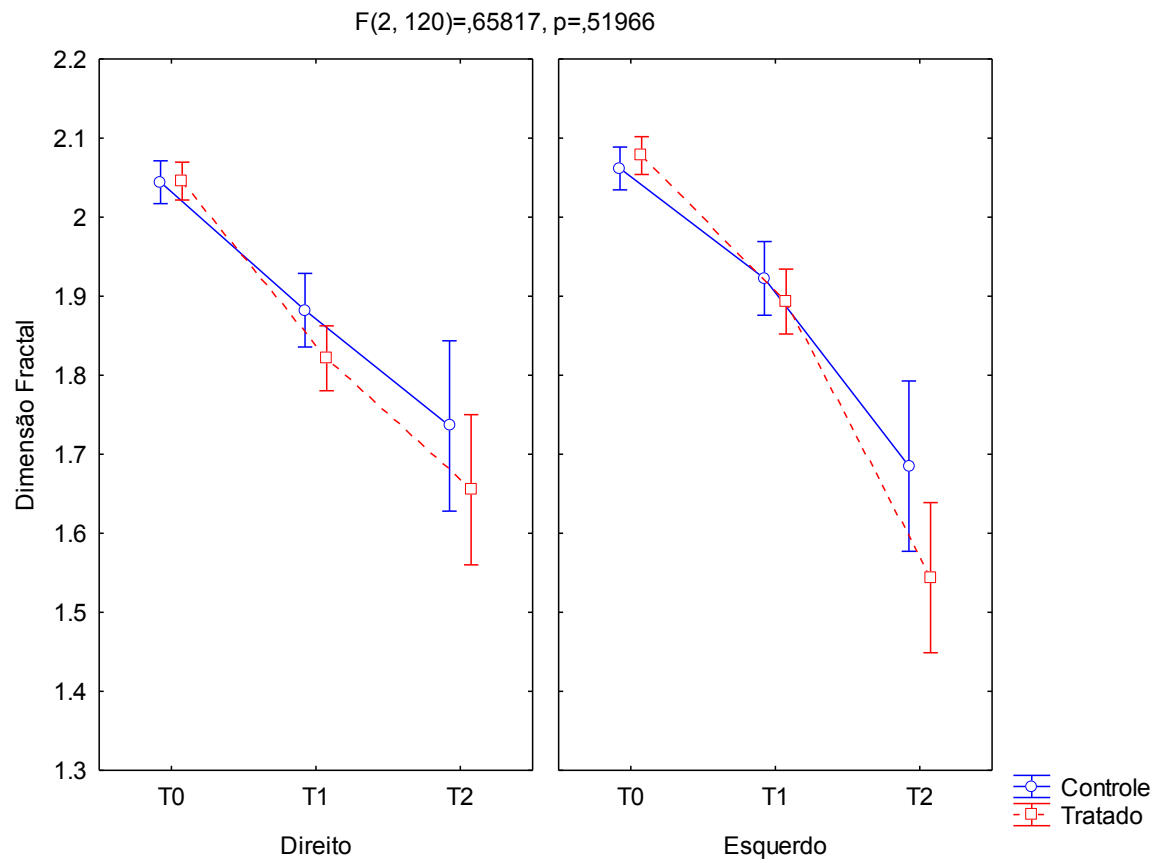


Figura 16. Médias e intervalos de confiança (95%) da dimensão fractal do trabeculado ósseo em relação aos grupos experimentais (Controle, Tratado), ao longo dos tempos de experimentação (T0, T1 e T2), do lado direito e esquerdo das avaliações.

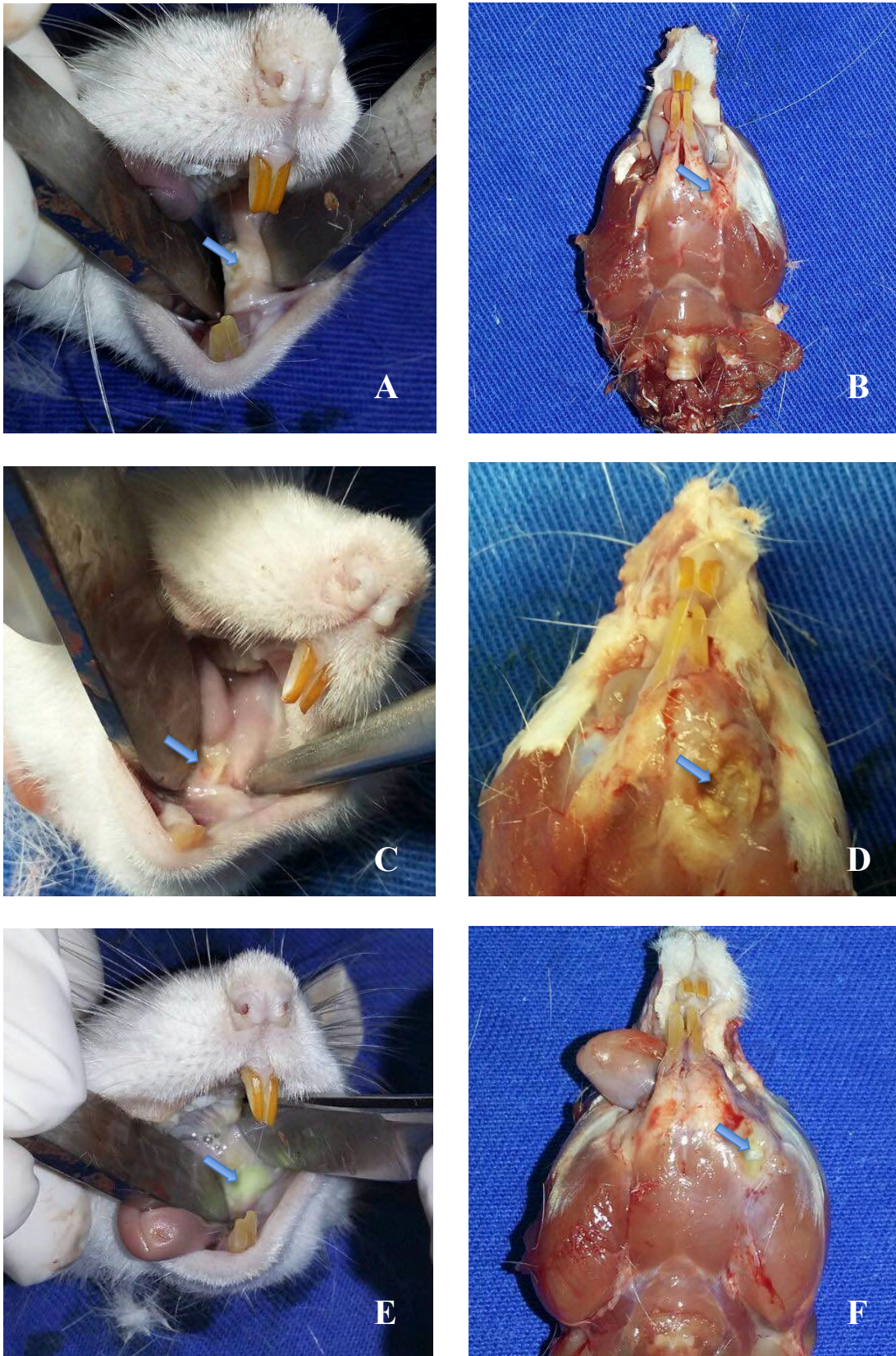


Figura 17. Imagens da cabeça antes e após dissecação do mesmo animal, respectivamente, em cada linha. **17A**, exposição óssea leve no animal GZ1C1 (seta azul). **17B**, formação de fistula extraoral na região esquerda da mandíbula (seta azul). **17C**, animal G1-ZC2 com exposição óssea moderada (seta azul). **17D**, fistula extraoral (seta azul). **17E**, animal G1-ZC3 com presença de secreção purulenta em fistula intraoral (seta azul). **17F**, observa-se fistula extraoral (seta azul).

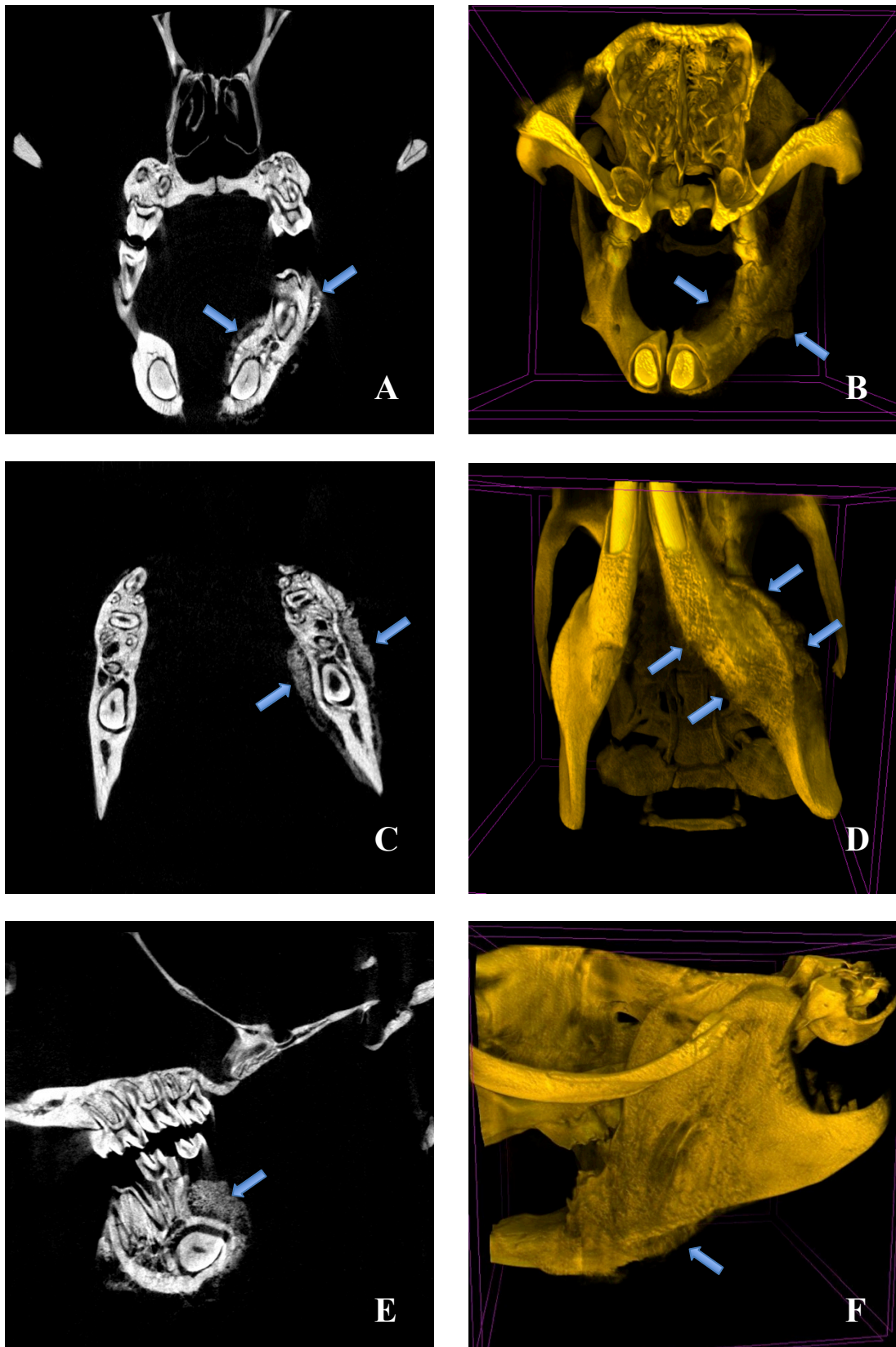


Figura 18: Reconstruções multiplanares bidimensionais e tridimensionais de microtomografias. **18A**, plano coronal e **18B**, vista coronal. **18C**, plano axial e **18D**, vista axial. **18E**, plano sagital e **18F**, vista sagital. Setas indicam reação periosteal (bicorticalização) na região esquerda da mandíbula da rata C2 do Grupo 2.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou reprodutibilidade ao induzir MRONJ com o uso do protocolo de aplicação de zolendronato, seguido de extração dentária (trauma), usando modelo animal, como Zandi et al., (2016); Jang et al., (2015); Ersan et al., (2014); Howie et al., (2015); Bi et al., (2010); Córdova et al., (2016); Takaoka., (2015). As alterações clínicas e tomográficas encontradas neste trabalho, usando modelo animal, mimetizam as que são descritas nos seres humanos. Finalmente, os três escaneamentos microtomográficos em momentos distintos, qualificaram e quantificaram as alterações ósseas da MRONJ, permitindo melhores inferências sobre a patogênese da doença.

A taxa de indução de MRONJ foi de 78% no grupo tratado, consonante com alguns trabalhos descritos na literatura (Zandi et al., 2016; Jang et al., 2015; Ersan et al., 2014; Howie et al., 2015). No entanto, dissonante de outros autores como Bi et al., 2010; Córdova et al., 2016; e Takaoka., 2015. Deve-se ressaltar que, nestes estudos supracitados que apresentaram resultados divergentes do presente estudo, as metodologias foram distintas. Os dois primeiros estudos usaram uma superdosagem de zolendronato e o último, uma subdosagem, quando comparadas com a dosagem do estudo de Zandi et al. (2016), que testou diferentes protocolos para indução de MRONJ, com o intuito de definir um protocolo na literatura. Por isso, o presente estudo se baseou na dosagem estabelecida por Zandi et al. (2016).

Neste estudo recente, os autores concluíram que o melhor protocolo utilizou uma dosagem 0,06mg/kg de zolendronato, semanal, por quatro semanas, seguido de exodontia e espera de quatro semanas; com um índice de sucesso de 83% de indução da doença. Portanto, este protocolo sugerido combinou melhores taxas de desenvolvimento da doença, com menor tempo de pesquisa, aliados a uma maior economia de insumos e materiais e um menor tempo de sofrimento e perda de ratos. Em relação ao tempo de espera para avaliação, os autores relataram que aguardar as oito semanas é dispensável, como a definição de diagnóstico de MRONJ para seres humanos (AAOMS – Ruggiero et al., 2014), Ao testar a espera de 8 semanas após exodontia nas ratas, não houve alteração na taxa de incidência da doença, apenas o agravamento dos sinais clínicos. Isto sugere que a MRONJ se desenvolveria em tempo diferente do ser humano. Por este motivo, o resultado do presente experimento, com 78% de exposição óssea nos grupos tratados, mostra que a metodologia usada foi eficiente. Além disso, Howie et al., (2015) criticaram diversos estudos, os quais provocam situações extremas para obterem altas taxas de MRONJ em animais, chegando a incidência de 100%, realizando

extrações dentárias múltiplas; uns se utilizam de sobredoses, muito além das aplicadas em humanos; e outros diagnosticam clinicamente MRONJ, porém sem nenhum exame complementar, como microtomografia ou histopatologia, para evidenciar a doença.

Mesmo diante de tamanha variação de protocolos com uso de modelo animal, nosso protocolo mostrou ser capaz de induzir MRONJ, nos mesmos percentuais descritos por muitos estudos na literatura. Outros estudos também utilizaram protocolos bem distintos, como o de Jang et al. (2016), que fizeram extração de incisivo ao invés de molar. Este protocolo, em nosso entendimento, não deve ser utilizado, pois seguramente afeta a dieta. Além disso, os incisivos dos murinos apresentam crescimento para compensar desgastes dos mesmos, por toda a vida do animal, destoando fisiologicamente dos incisivos humanos, podendo apresentar viés para a pesquisa. Quanto ao fato de poder afetar a dieta, pelo esforço mastigatório, isto pode levar a um déficit nutricional. Há estudos, como o de Hokugo et al., 2010, com uso de subdosagem de zolendronato em grupo com e sem deficiência de vitamina D, em que houve desenvolvimento de MRONJ em maxilas de 66,7% do grupo com deficiência em vitamina D, contra, 14,3%, do grupo sem deficiência de vitamina D. Além disso, perda de massa corpórea, por deficiência nutricional pode levar viés para pesquisa, principalmente viés de confundimento, em que não é possível inferir causa e efeito certo ao uso do bifosfonato ou à desnutrição. Levando a questão nutricional como um risco de viés, é que o presente estudo introduziu alimentos macios como damasco, além de frutas secas e granola, juntamente à ração, nas seis semanas após a exodontia. Em geral, a amostra não apresentou perda ponderal, exceto em quatro dos animais tratados, que somente na última semana do experimento, apresentaram perda de massa corporal devido a severidade das lesões da MRONJ (**apêndice 1**).

No presente estudo, houve diferença estatística significativa entre os grupos de estudos e os de controles, quanto às presenças de exposição óssea, abscesso, fístulas intra e/ou extraorais, cortical íntegra e sequestro ósseo. Essas características, segundo Ruggiero et al. (2014), são os sinais clínicos e radiográficos reconhecidos da MRONJ. Entretanto, não foi estabelecida diferença significativa em relação à presença de lesão na região óssea na área de exodontia, devido principalmente à presença de restos radiculares e fratura de parte do segundo molar, ocorridos em muitos ratos tratados e controles. A persistência de restos radiculares se deu pela dificuldade técnica durante o procedimento cirúrgico, tais como: tempo para extração reduzido, pelo fato da apnéia causada pelo sedativo, aliada à dificuldade respiratória causadas pelas posição supina e manipulação lingual com uso de afastadores

nestes animais. Esse quadro levou a sucessivas interrupções durante a cirurgia, para posicionar as ratas lateralmente, e a espera para recuperação das mesmas, bem como para realizar reanimações, a partir de massagem torácica. Em face a essas dificuldades, foram perdidas três ratas, no transcirúrgico e deixados alguns restos radiculares pelo risco de perda de amostra.

A presença de raízes ou restos radiculares pode ter induzido, como consequência do processo inflamatório formado, o quadro de lesão periapical, encontrado em alguns animais. Tais lesões foram detectadas pelas imagens microtomográficas. Entretanto, lesão periapical, devido à uma periodontite apical, não é sinal indicativo de MRONJ. É, segundo Neville et al., (2009), um processo inflamatório, que geralmente ocorre quando há presença de foco infeccioso (resto radicular) ou trauma (exodontia). Assim sendo, a presença de restos radiculares igualmente distribuída em mandíbulas de ratas dos dois grupos (tratados e controles); provavelmente a causa do resultado semelhante da distribuição das lesões periapicais, não pode ser considerada um sinal de MRONJ, mas agir como potencializadora, quando relacionada ao uso de BFs.

Essa limitação técnica não foi encontrada em outros artigos. Em geral os artigos não relatam nenhuma intercorrência ocorrida durante as exodontias e não mencionam dificuldades técnicas para as mesmas. Mesmo com limitações, esse modelo propiciou a análise quantitativa e qualitativa na MRONJ, tal como Howie et al., (2015).

A análise microtomográfica dos parâmetros ósseos foi feita nos dois grupos (controle e tratado com zolendronato), nos lados direito e esquerdo (lado da exodontia) e nos três momentos de avaliação microtomográfica (T_0 : avaliação inicial, T_1 : após a medicação; T_2 : após as extrações). Foram avaliados os parâmetros de densidade mineral óssea (DMO), espessura das trabéculas (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N), espaçamento entre as trabéculas (Tb.Sp) e dimensão fractal (DF). Para a avaliação destes parâmetros ósseos, inicialmente foi selecionada uma região de interesse (ROI) na área do trabeculado ósseo, limitada inferior superiormente pelo incisivo e pelas estruturas periapicais do primeiro molar, respectivamente; e lateralmente, limitada entre o canal mandibular e a cortical óssea lingual. Desta forma, a análise não foi obtida em região de osteonecrose. Os resultados conferiram com esta análise, já que não houve diferenças estatisticamente significativas entre lado direito e esquerdo (extração), ou seja, lado sem e com possibilidade de osteonecrose, respectivamente; tanto nos grupos tratados com zolendronato quanto nos grupos controles. Este dado foi importante, pois observou-se que estas medidas não estão relacionadas

especificamente as alterações da MRONJ, que neste estudo, sugerem ser alterações locais, aparentemente restritas a região de trauma (exodontia). Este resultado está em consonância com outros estudos, tais como Pichardo et al., (2016) e Howie et al., (2015), que também relatam uma certa evidência de que o trauma, que poderia servir como um gatilho para MRONJ, teria um efeito local. Já que não houve alteração óssea a partir das medidas obtidas da construção da área de interesse (ROI), em área óssea abaixo da região periapical, quando se comparam as mesmas regiões do lado esquerdo (extração) e direito. Ou seja, no osso subjacente à área da lesão de MRONJ (quando a mesma ocorreu), não foram verificadas alterações clássicas da doença, detectáveis pela microtomografia. Assim, os resultados possibilitaram inferir, que as medidas obtidas pelos parâmetros estabelecidos, mostraram as alterações ósseas sistêmicas causadas pela medicação e não pela MRONJ, que seriam modificações locais associadas ao trauma. Então, quando observadas as medidas obtidas, tanto para o grupo tratado com zolendronato quanto para o grupo controle, observou-se que as ratas do grupo controle sofreram basicamente o efeito do envelhecimento ósseo natural, em que atuam os efeitos da idade (início da pesquisa, ratas com 6 semanas, equivalente à idade de maturidade sexual dos ratos Wistar, e termina com 16 semanas, o equivalente a um adulto maduro), e conseqüentemente, por serem ratas, ocorre a atuação da variação hormonal neste processo de envelhecimento (Andreollo et al., 2012).

Quando analisada a interação dos parâmetros quantitativos, foi possível observar que, pela interação dos fatores analisados (grupo experimental e análises das microtomografias em três tempos distintos), não houve diferenças estatisticamente significativas. Entretanto, com a análise dos parâmetros separadamente, em relação aos tempos T_0 e T_2 (pois, de T_0 para T_1 , a diferença de tempo foi muito pequena, apenas 3 semanas), observou-se no grupo controle, o envelhecimento das ratas, que pode ser devido à uma osteopenia natural. Assim, notou-se o declínio natural da densidade mineral óssea nas ratas não tratadas (grupo controle), bem como a redução da espessura das trabéculas, a redução do número das mesmas e o aumento da separação entre ela e a queda da dimensão fractal. Todas estas alterações nos parâmetros ósseos microtomográficos são semelhantes aos observados por estudo prévio que induziu o climatério em ratas por meio de ovariectomia (Mavropoulos et al., 2014). Portanto, estas alterações ósseas microtomográficas podem estar associadas ao envelhecimento.

Ao analisar os parâmetros de forma individual para as ratas tratadas com zolendronato, observou-se os efeitos clássicos dos BFs, que são os efeitos anticatabólicos ósseos, que reduzem a remodelação óssea (Valachis et al., 2013; Kämmerer et al., 2016 e Junqueira et al.,

2014), mantendo a densidade mineral óssea (DMO) de T_0 para T_2 , interferindo nos efeitos de envelhecimento ósseo naturais. Bi et al., (2010) relataram que os BFs restauram efetivamente a densidade mineral óssea (DMO) e a resistência óssea, corroborando com estes resultados.

Com relação aos outros parâmetros, eles atuam de forma coerente de T_0 para T_2 , e de forma semelhante, tanto para o grupo tratado com zolendronato quanto para o controle, não tendo servido para avaliar os efeitos isolados da medicação nos tratados, pois o processo de envelhecimento ósseo que ocorreu no grupo controle, atuou reduzindo a complexidade (porosidade) óssea observadas na análise de dimensão fractal (DF). E este efeito é o mesmo observado no grupo com uso de BFs, em que ocorre fisiopatologicamente, pelo processo de apoptose de osteoblastos e osteoclastos, uma redução no colágeno e na matriz óssea, havendo em consequência, uma redução na complexidade trabecular óssea, medida na dimensão fractal (DF). (Kumar et al., 2010; Ruggiero, 2011; Xue et al., 2014). Esses processos patofisiológicos da MRONJ são semelhantes que ocorre no processo medular durante envelhecimento ósseo. Entretanto, no uso de BF, a redução do catabolismo ósseo, aumenta a mineralização do osso, mas pelo estudo, essa mesma não ocorre de forma organizada, a partir das trabéculas e sim, nos espaços entre e intratrabeculares. Com esta redução da complexidade óssea, que ocorre tanto no uso de BF, quanto no envelhecimento (Mavropoulos et al., 2014), observou-se nos dois grupos de estudo, uma redução também na espessura trabecular (Tb.Th). Infere-se que o desbalanço na remodelação óssea, gere substituição de colágenos, e conseqüentemente, sua substituição por mineral. O que confere ao osso envelhecido e com zolendronato, baixa elasticidade ou resiliência. Observou-se em ambos os grupos e pelos mesmos motivos anteriores, também a diminuição do número de trabéculas (Tb.N), levando assim, ao aumento de separação entre trabéculas (Tb.Sp). Podendo inferir, que houve uma redução do número delas, ou seja, aumentou-se o espaçamento entre as mesmas.

O fato de ter usado ratas ao invés de ratos no experimento (fator hormonal feminino e osteopenia), agiu no experimento como fator limitante. Pois, exceto o parâmetro DMO, os parâmetros convergiram. Podendo-se inferir que a atuação fisiológica em ambos processos (de envelhecimento e dos BFs) quanto à redução de complexidade óssea são semelhantes. Outro fator limitante, foi a iniciação do experimento em ratas jovens, com um mês e meio de vida e ter finalizado com ratas de meia idade, com quatro meses. Desta forma, o envelhecimento das ratas atuou como fator confundidor, dificultando as medições microtomográficas.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

O estudo em modelo animal utilizando ratas Wistar com protocolo medicamentoso com zolendronato permitiu:

- O modelo de estudo foi capaz de desenvolver MRONJ de forma reprodutível e em consonância com os índices descritos pela literatura.
- As três fases distintas de μ TC possibilitaram certificar a respeito da temporalidade das alterações ósseas, bem como a inferir, que há alterações microestruturais ósseas possíveis de serem detectadas precocemente, 3 semanas após o uso da medicação.
- Foi possível observar que o trauma age como um potencializador sobre a doença, podendo inferir que sua ação é tão preponderante sobre a etiologia, que poderia considerar o mesmo, como um “gatilho” para MRONJ.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Abtahi, J., Agholme, F., Sandberg, O and 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; Volume 41(6), p. 494-99.
- Aghaloo, T., Kang, B., Sung, E., Shoff M., et al. Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. *J Bone Miner Res*, 2011; Volume 26(8), p. 1871-82.
- Allen, M. and Burr, D. Mandible matrix necrosis in beagle dogs after 3 years of daily oral bisphosphonate treatment. *J Oral Maxillofac Surg*, 2008; Volume 66(5), p. 987-94.
- Ali-Erdem, M., Burak-Cankaya, A., Cemil-Isler, S., Demircan, S., et al. 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; Volume 16(7), p. 879-83.
- Andreollo, N., Santos, E., Araújo, M., Lopes, L. Rat's age versus human's age: what is the relationship? *ABCD Arq Bras Cir Dig*, 2012; Volume 25(1), p. 49-51.
- Arce, K., Assael, L., Weissman, J., Markiewicz, M. Imaging findings in bisphosphonate-related osteonecrosis of jaws. *J Oral Maxillofac Surg*, 2009; Volume 67(5), p. 75-84.
- Benlidayi, I., Guzel, R. Oral Bisphosphonate Related Osteonecrosis of the Jaw: A Challenging Adverse Effect. *J ISRN Rheumatology*, 2013; Volume 2013, p. 1-6.
- Bi, Y., Gao, Y., Ehrichiou, D., Cao, C., et al. Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *Am J Pathol*, 2010; Volume 177(1), p. 280-90.
- Biasotto, M., Chiandussi, S., Zacchigna, S., Moimas, S., et al. A novel animal model to study non-spontaneous bisphosphonates osteonecrosis of jaw. *J Oral Pathol Med*. 2010; Volume 39(5), p. 390-96.
- Chiandussi, S., Biasotto, M., Dore, F., Cavalli, F., et al. Clinical and diagnostic imaging of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Dentomaxillofac Radiol*, 2006; Volume 35(4), p. 236-243.

- Córdova, L., Guilbaud, F., Amiaud, J., Battaglia, S., et al. Severe compromise of preosteoblasts in a surgical mouse model of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 2016; p. 1-8.
- Franco, S., Miccoli, S., Limongelli, L., Tempesta, A., et al. New Dimensional Staging of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw Allowing a Guided Surgical Treatment Protocol: Long-Term Follow-Up of 266 Lesions in Neoplastic and Osteoporotic Patients from the University of Bari. *International Journal of Dentistry*, 2014; Volume 2014, p. 1-10.
- Goodman, L and Gilman, A. Fármacos que afetam a homeostasia dos íons minerais e a renovação óssea. In: Laurence L. (ed.) *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, 11. ed. Porto Alegre: AMGH; 2010. p. 1489-1517.
- Hokugo, A., Christensen, R., Chung, E., Sung, E., et al. Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with vitamin D deficiency in rats. *J Bone Miner Res*, 2010; Volume 25 (6), p. 1337-49.
- Howie, R., Borke, J., Kurago, Z., Daoudi, A., et al. A Model for Osteonecrosis of the Jaw with Zoledronate Treatment following Repeated Major Trauma. *PLoS ONE*, 2015; Volume 10(7), p. 1-16. doi:10.1371/journal.
- Huja, S., Mason, A., Fenell, C., Mo, X., et al. Effects of short-term zoledronic acid treatment on bone remodeling and healing at surgical sites in the maxilla and mandible of aged dogs. *J Oral Maxillofac Surg*, 2011; Volume 69(2), p. 418-27.
- Jang, H., Kim, J., Cha, I. Development of animal model for Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery*, 2015; Volume 37 (18), p.1-7.
- Junqueira, L., Pelaz, A., Gallego, L., García-Consuegra, L., Costilla, S. Bisphosphonate-Related Osteonecrosis Associated With Dental Implants: A MicroComputed Tomography Study. *Implant Dentistry*; 2014; Volume 23, number 3, p. 258-263.
- Kämmerer, P., Thiem, D., Eisenbeiß, C., Dau, M., et al. Surgical evaluation of panoramic radiography and cone beam computed tomography for therapy planning of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral and Maxillofacial Radiology*, 2016; Volume 121, p. 419-424.

- Kim, K., Rhee, Y., Kwon, T., Lee, J. Medication Related Osteonecrosis of the Jaw: 2015 Position Statement of the Korean Society for Bone and Mineral Research and the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. *J Bone Metab*, 2015; Volume 22, p.151-165.
- Koba, W., Jelicks, L., Fine, E. MicroPET/SPECT/CT Imaging of small Animal Models of Disease. *J The American Journal of Pathology*, 2013; Volume 182, p. 319-324.
- Kobayashi, Y., Hiraga, T., Ueda, A., Wang, L., 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*, 2010; Volume 28(2), p. 165-75.
- Kumar, S., Gorur, A., Schaudinn, C., Shuler, C. The role of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaw associated with bisphosphonate therapy. *Curr Osteoporos Rep*, 2010; Volume 8(1), p. 40-8.
- Landesberg, R., Cozin, M., Cremers, S., Woo, V., et al. Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg*, 2008; Volume 66(5), p. 839-47.
- Lang, M., Zhou, Z., Shi, L., Niu, J., et al. Influence of zoledronic acid on proliferation, migration, and apoptosis of vascular endothelial cells. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2016; p. 1-5.
- Leite, A., Figueiredo, P., Melo N., Acevedo, A., et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. Report of a case end literature review. *J Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2006; Volume 102(1), p.14-21.
- Lesclous, P., Abi Najm, S., Carrel, J., Baroukh, B., et al. Bisphosphonate- associated osteonecrosis of the jaw: a key role of inflammation? *Bone*, 2009; Volume 45(5), p. 843-52.
- Luz, F. Modelo animal e indução de osteonecrose por uso de bisfosfonatos em ratos com análise microtomográfica. [Dissertação de mestrado]. Brasília: Pós-graduação em Ciências da Saúde. Universidade de Brasília; 2013.
- Marino, K., Zakhary, I., Abdelsayed, R., Carter, J., et al. Development of a rat model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *J Oral Implantol*, 2012; Volume 38, p. 511-18.

- Marx, R. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac. Surg*, 2003; Volume 61(9), p. 1115-1117.
- Mavropoulos, A., Kiliaridis, S., Rizzoli, R., Ammann, P. Normal masticatory function partially protects the rat mandibular bone from estrogen-deficiency induced osteoporosis. *Journal of Biomechanics*, 2014; Volume 47, p.2666–2671.
- NEVILLE, B.W. et al. *Patologia Oral & Maxilofacial*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009.
- Pautke, C., Kreutzer, K., Weitz, J., Knödler, M., et al. Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw: A minipig large animal model. *Bone*, 2012; Volume 51(3), p. 592-99.
- Perilli, E., Le, V., Ma, B., Salmon, P., et al. Detecting early bone changes using in vivo micro-CT in ovariectomized, zoledronic acid-treated, and sham-operated rats. *Osteoporos Int*, 2010; Volume 21(8), p. 1371-82.
- Pichardo, S., Kuijpers, S., Richard, J., Merkesteyn, V. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: Cohort study of surgical treatment results in seventy-four stage II/III patients. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 2016; p. 1-5.
- Ruggiero, S. and Drew, S. Osteonecrosis of the jaws and bisphosphonate therapy. *J Dent Res*, 2007; Volume 86(11), p. 1013-21.
- Ruggiero, S., Dodson, T., Fantasia, J., Goodday, R., et al. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw - 2014 Update. *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 2014. PLoS ONE; Volume 10(7), p. 1-16.
- Rasmusson, L. and Abtahi, J. Bisphosphonate Associated Osteonecrosis of the Jaw: An Update on Pathophysiology, Risk Factors, and Treatment. *International Journal of Dentistry*, 2014; Volume 2014, p. 1-9.
- Scheper, M., Badros, A., Chaisuparat, R., Cullen, K., et al. Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Br J Haematol*, 2009; Volume 144(5), p. 667-76.
- Senel, F., Duman, M., Muci, E., Cankaya, M., et al. Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. *J Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2010; Volume 109(3), p. 385-91.

- Sentürk, M., Cimen, E., Öncül, A., Cambazoglu, M. Oncologists awareness about bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws. *J Pak Med Assoc*, 2016; p. 880-883.
- Takaoka, K., Yamamura, M., Nishioka, T., Abe, T., et al. Establishment of an Animal Model of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws in Spontaneously Diabetic Torii Rats. *PLoS ONE*, 2015; Volume 10(12), p.1-14.
- Treister, N., Friedland, B., Woo, S. *J Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2010; Volume 109(5), p. 753-64.
- Tseng, H., Kanayama, K., Kaur, K., Park, S. Bisphosphonate-induced differential modulation of immune cell function in gingiva and bone marrow *in vivo*: Role in osteoclast-mediated NK cell activation. *Oncotarget*, 2015; Volume 6 (24). p. 20002-20025.
- Valachis, A., Polyzos, N., Coleman, R., Gnant, M., et al. Adjuvant Therapy With Zoledronic Acid In Patients With Breast Cancer: A Systematic Review And Meta-Analysis. *The Oncologist*, 2013; Volume 18, p. 353–361.
- Xue, D., Li, F., Chen, G., Yan, S., et al. Do bisphosphonates affect bone healing? A Meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 2014; Volume 9, p.45.
- Zandi, M., Dehghan, A., Malekzadeh, H., Janbaz, P., et al. Introducing a protocol to create bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rat animal model. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 2016; p. 1-8.
- Weinstein, R., Roberson, P., Manolagas, S. Giant osteoclast formation and long-term oral bisphosphonate therapy. *N Engl J Med*, 2009; Volume 360(1), p. 53-62.

ANEXO

ANEXO



Universidade de Brasília
 Instituto de Ciências Biológicas
 Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 13 de maio de 2016.



DECLARAÇÃO – Prorrogação de Prazo

Declaramos que o projeto intitulado **“MODELO ANIMAL DE OSTEONECROSE ASSOCIADO AO USO DE BIFOSFONATOS: AVALIAÇÃO POR MICROTOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE PÓSITRONS.”**, UnBDoC n.º 5772/2015, sob responsabilidade do Professor Paulo Tadeu de Souza Figueiredo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Rattus norvegicus*: 40. A presente aprovação é válida pelo período de 01/12/2014 a 30/12/2016.



uspama

Profa. Dra. Paula Diniz Galera
 Coordenadora da CEUA – UnB

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

APÉNDICE

APÊNDICE

Grupo 1											
Zometa - Peso											Perda:1
Ratas	Data:19/07	Data:21/07	Data:25/07	Data:29/07	Data:02/08	Data:04/08	Data:09/08	Data:12/08	Data:15/08	Data:19/08	Análise
A 1	341	347	362	362	366	371	373	372	378	378	↑
A 2	414	422	433	434	434	445	431	440	437	441	↑
A 3	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu
A 4	308	314	331	330	336	335	343	347	349	356	↑
B 1	380	393	406	407	425	431	425	436	429	443	↑
B 2	309	321	329	336	342	349	343	354	359	369	↑
B 3	290	294	308	308	319	321	321	318	322	332	↑
C 1	355	366	381	382	380	381	377	372	374	378	↓
C 2	340	343	348	351	357	356	354	358	355	326	↓
C 3	326	329	337	343	352	358	357	359	363	371	↑
Controle											Perda:5
Ratas	Data:19/07	Data:21/07	Data:25/07	Data:29/07	Data:02/08	Data:04/08	Data:09/08	Data:12/08	Data:15/08	Data:19/08	Análise
A 1	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou
A 2	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou
A 3	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou
A 4	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou	sacrificou
B 1	319	326	335	343	349	354	362	359	370	377	↑
B 2	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu
B 3	297	305	319	323	336	338	342	343	358	362	↑
C 1	367	363	372	379	376	387	387	382	391	393	↑
C 2	360	367	386	389	400	401	406	407	420	430	↑
C 3	356	362	371	381	396	397	400	408	420	426	↑

Grupo 2											
Zometa - Peso											Perda:1
Ratas	Data:25/07	Data:29/07	Data:02/08	Data:04/08	Data:09/08	Data:12/08	Data:15/08	Data:19/08	Data:24/08	Análise	
A 1	305	306	318	313	318	329	326	332	337	↑	
A 2	351	352	367	366	371	372	373	379	387	↑	
A 3	309	319	327	325	327	329	332	334	342	↑	
A 4	371	380	389	393	390	404	403	409	409	↑	
B 1	333	337	348	347	340	349	356	323####	344	↑	
B 2	320	328	334	336	336	335	335	335	321	↓	
B 3	328	333	345	343	339	337	351	351	340	↓	
C 1	291	298	301	309	308	315	322	328	335	↑	
C 2	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	
C 3	281	285	291	289	302	311	323	317	339	↑	
Controle-Peso											Perda:1
Ratas	Data:25/07	Data:29/07	Data:02/08	Data:04/08	Data:09/08	Data:12/08	Data:15/08	Data:19/08	Data:24/08	Análise	
A 1	260	273	280	276	278	276	280	281	289	↑	
A 2	291	306	320	318	332	336	355	359	365	↑	
A 3	315	332	338	343	348	355	364	361	372	↑	
A 4	408	413	424	426	430	436	439	442	440	↑	
B 1	294	303	309	313	310	321	325	330	338	↑	
B 2	321	323	338	338	339	341	347	350	361	↑	
B 3	385	395	406	402	410	410	429	438	439	↑	
C 1	290	301	313	317	320	328	343	340	350	↑	
C 2	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	faleceu	
C 3	331	338	349	353	346	354	362	362	365	↑	