

FERNANDA OGATA LUZ

**MODELO ANIMAL DE INDUÇÃO DE OSTEONECROSE POR USO DE
BISFOSFONATOS EM RATOS COM ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA**

Brasília

2013

FERNANDA OGATA LUZ

**MODELO ANIMAL DE INDUÇÃO DE OSTEONECROSE POR USO DE
BISFOSFONATOS EM RATOS COM ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Tadeu de Souza Figueiredo

Brasília

2013

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos que me guiaram ao sucesso e que sempre confiaram em minha capacidade, em especial:

Ao meu marido, amigo e incansável companheiro Edward, que sempre me apoiou e me incentivou nas horas difíceis.

Aos meus pais, irmãos e sobrinhas que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Aos Professores Paulo e André pela imensa paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

Agradecimentos

À Prof^a. Dra. Nilce Santos de Melo, que foi a minha primeira orientadora ainda na graduação e por quem tenho a mais profunda admiração por sua trajetória profissional e brilhantismo intelectual.

À Prof^a. Dra. Eliete Neves da Silva Guerra por sua contribuição e apoio durante toda a execução deste trabalho.

Aos Profs. Dr. Sacha Braun e Ricardo Bentes de Azevedo por sua prestatividade e incansável apoio no ensino de todas as etapas do manuseio do microtomógrafo.

Aos Profs. Hugo Cesar Pinto Marques Caracas, Filipe Ramos Barra, Sérgio Bruzadelli e Ana Patrícia de Paula pelo auxílio durante o experimento.

Aos veterinários, Gabriela e Rafael que não mediram esforços no cuidado dos animais desde o seu acolhimento até os momentos finais do experimento.

Ao Prof. Dr. Gabriel Marroig da Universidade de São Paulo por sua contribuição e auxílio nas aquisições de imagens no microtomógrafo.

À Prof^a. Dra. Ana Tereza por sua inestimável contribuição nas análises estatísticas deste estudo.

Aos Técnicos do Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde pelo cuidado e atenção diários com nossos animais.

Aos amigos e colegas, pelo incentivo e pelo apoio constantes.

"A ciência nunca resolve um problema
sem criar pelo menos outros dez."
(*George Bernard Shaw*)

Resumo

O objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo animal de osteonecrose associada ao uso de bisfosfonatos (BRONJ) em ratos e investigar as alterações ósseas em maxila e mandíbula, clinicamente e por meio de microtomografia computadorizada. O presente estudo utilizou 28 ratas da linhagem *Wistar*. Os animais foram divididos em quatro grupos: Grupo Zolendronato 1 (ZA1), receberam zolendronato 66 µg/kg, três vezes por semana, durante seis semanas; Grupo 2: Grupo Zolendronato 2 (ZA2), receberam, zolendronato 66µg/kg, três vezes por semana, durante oito semanas; Grupo 3: Grupo Controle 1 (C1), receberam soro fisiológico, três vezes por semana, durante seis semanas e Grupo 4: Grupo Controle 2 (C2), receberam soro fisiológico, três vezes por semana, durante oito semanas. Três semanas após o início da medicação, os ratos foram aleatoriamente selecionados e submetidos, ou à extração do primeiro molar superior, ou à extração do primeiro molar inferior ou não teve procedimentos cirúrgicos realizados. Todos animais foram avaliados clinicamente e por meio de microtomografia computadorizada no início do experimento e 90 dias após o início da medicação. Nenhum dos animais do grupo controle desenvolveu a BRONJ. Quando avaliados os animais que foram medicados e que foram submetidos à exodontia, 93% deles desenvolveram a osteonecrose clínica e 86% apresentavam lesões osteolíticas ao exame microtomográfico. Ainda considerando os grupos de animais que tiveram extrações dentárias realizadas, a reação periosteal/bicorticalização foi observada em 2 animais que tiveram molares superiores extraídos (29%) e em todos os ratos que tiveram molares inferiores extraídos (100%). Pode-se afirmar portanto que, nas doses e tempo de uso de bisfosfonatos propostos neste modelo e com a associação do trauma pela exodontia, é possível desenvolver a BRONJ em ratos.

Descritores: Osteonecrose da Arcada Osseodentária Associada a Bisfosfonatos;

modelos animais de doenças, ácido zoledrônico, microtomografia por raio-x.

Abstract

The aim of this study was to develop an animal model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) in rats and investigate bone changes in jaws clinically and by computed microtomography. The present study used 28 female Wistar rats. The animals were divided into four groups: Group zolendronate 1 (ZA1), received 66µg/kg three times per week for six weeks; Group zolendronate 2 (ZA2), received zolendronate 66µg/kg three times per week for eight weeks; Control group 1 (C1), received saline solution three times a week for six weeks and Control group 2 (C2), received saline solution three times a week, for eight weeks. Three weeks after starting the drug, the mice were randomly selected and submitted to the extraction of the first molar, or extraction of the mandibular first molar or had no surgical procedures performed. All animals were evaluated clinically and by computed microtomography at baseline and 90 days after the start of medication. None of the control animals developed BRONJ. When evaluated animals were treated and underwent extraction, 93% of them developed clinical osteonecrosis and 86% had osteolytic lesions by microtomographic examination. Still considering the groups of animals that had extractions performed, the periosteal reaction was observed in two animals that had upper molar extracted (29%) and in all mice that had mandibular molar extracted (100%). It can be argued, therefore, that in the doses and duration of use of bisphosphonates proposed in this model and in the association of trauma by extraction, it is possible to develop BRONJ in rats.

Keywords: Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw, animal disease models, zoledronic acid, x-ray microtomography

Lista de figuras

Figura 1. Estrutura química básica dos bisfosfonatos.....	19
Figura 2. Diagrama do delineamento experimental inicial.....	55
Figura 3. Diagrama do delineamento experimental final.....	54
Figura 4. Administração da medicação dos animais.....	58
Figura 5. Procedimento cirúrgico de exodontia.....	59
Figura 6. <i>Timeline</i> do delineamento da pesquisa.....	60
Figura 7. Aquisição das imagens por meio do microtomógrafo.....	63
Figura 8. Frequência relativa percentual da presença de osteonecrose clínica em ratos controle e submetidos ao tratamento com bisfosfonato por 6 e 8 semanas.....	65
Figura 9. Frequência relativa percentual da presença de osteonecrose clínica em ratos controle e submetidos ao tratamento com bisfosfonato, que apresentaram extração dos molares superiores (MS), molares inferiores (MI) ou não extração.....	66
Figura 10. Aspectos clínicos das lesões de osteonecrose em animais que receberam bisfosfonatos.....	67
Figura 11. Frequência relativa percentual das classificações microtomográficas de lesão osteolítica em ratos controle e submetidos ao tratamento com bisfosfonato por 6 e 8 semanas.....	68
Figura 12. Frequência relativa percentual da reação periosteal em ratos controle e submetidos ao tratamento com bisfosfonato por 6 e 8 semanas.....	69
Figura 13. Frequência relativa percentual das classificações tomográficas de lesão osteolítica em ratos controle e submetidos ao tratamento com bisfosfonato, que apresentaram extração dos molares superiores (MS), molares inferiores (MI) ou não extração.....	70
Figura 14. Frequência relativa percentual de reação periosteal em ratos controle e submetidos ao tratamento com bisfosfonato, que apresentaram extração dos molares superiores (MS), molares inferiores (MI) ou não extração.....	71
Figura 15. Imagens de microtomografia de rato tratado com seis semanas de ácido zoledrônico e que foi submetido à extração do primeiro molar superior esquerdo.....	72
Figura 16. Imagens de microtomografia de rato tratado com seis semanas de ácido zoledrônico e que foi submetido à extração do primeiro molar inferior esquerdo.....	73
Figura 17. Imagens de microtomografia de rato tratado com oito semanas de ácido zoledrônico e que foi submetido à extração do primeiro molar inferior esquerdo.....	74
Figura 18. Imagens de microtomografia de rato tratado com oito semanas de ácido zoledrônico e que foi submetido à extração do primeiro molar superior esquerdo.....	75
Figura 19. Imagens de microtomografia de rato tratado com oito semanas de ácido zoledrônico e que foi submetido à extração do primeiro molar inferior esquerdo.....	76

Lista de quadros

Quadro 1. Classificação, princípio ativo, nome comercial e dose usual dos bisfosfonatos.....	20
Quadro 2. Estadiamento da BRONJ.....	35

Lista de tabelas

Tabela 1. Frequências absolutas e relativas (%) das alterações ósseas evidenciadas no exame microtomográficos dos ratos controle e submetidos ao tratamento com bisfosfonato por 6 e 8 semanas.....68

Tabela 2. Frequências absolutas e relativas (%) das lesões osteolíticas evidenciadas pelas microtomografias dos ratos controle e submetidos ao tratamento com bisfosfonato, que apresentaram extração dos molares superiores (MS), molares inferiores (MI) ou não extração.....70

Lista de abreviaturas e siglas

3D	Tridimensional ou três dimensões
AAOMS	Associação Americana de Cirurgiões Buco-maxilo-faciais
ADA	American Dental Association (Associação Americana de Odontologia)
ARAONJ	Antiresorptive associated osteonecrosis of the jaw (Osteonecrose maxilomandibular associada a antirreabsortivo)
ATP	Adenosina trifosfato
BAONJ	Bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw (Osteonecrose maxilomandibular associada ao bisfosfonato)
BF	Bisfosfonato
BFs	Bifosfonatos
BRON	Bisphosphonate-related osteonecrosis (Osteonecrose relacionada aos bisfosfonatos)
BON	Bisphosphonate osteonecrosis (Osteonecrose por bisfosfonato)
BRONJ	Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (Osteonecrose maxilo-mandibular relacionada à bisfosfonatos)
DMO	Densidade mineral óssea
FPP	Farnesil difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
IPP	Isopentenil difosfato
IV	Intravenosa
kg	Quilograma
mgHA/cc	Miligramas por unidade de volume
microPET	Microtomografia por emissão de pósitrons
microTC	Microtomografia computadorizada
mm	Milímetro
ONJ	Osteonecrosis of the jaw (Osteonecrose maxilomandibular)
PYD	Piridínio
TC	Tomografia computadorizada
UI	Unidade internacional
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
µm	Micrômetro
µTC	Microtomografia computadorizada

Sumário

1. Introdução.....	13
2. Revisão da literatura.....	17
2.1. Os bisfosfonatos como inibidores de reabsorção óssea.....	18
2.2. Estrutura química dos bisfosfonatos.....	18
2.3. Farmacologia dos bisfosfonatos.....	19
2.4. Tipos de bisfosfonatos e apresentações farmacológicas.....	20
2.5. Mecanismo de ação dos bisfosfonatos.....	22
2.6. Aplicações clínicas e efeitos adversos dos bisfosfonatos.....	23
2.7. BRONJ: definição e nomenclaturas.....	25
2.8. Incidência e Prevalência da BRONJ.....	27
2.9. Fisiopatologia da BRONJ.....	28
2.10. Fatores de risco para a BRONJ.....	30
2.11. Sinais clínicos, sintomas e diagnóstico diferencial da BRONJ.....	32
2.12. Estadiamento da BRONJ.....	33
2.13. Aspectos imagenológicos da BRONJ.....	35
2.14. A microtomografia computadorizada na avaliação óssea.....	37
2.15. Modelos animais de osteonecrose.....	39
3. Objetivos.....	51
3.1. Objetivo Geral.....	52
3.2. Objetivos Específicos.....	52
4. Metodologia.....	53
4.1. Animais e medicação.....	54
4.2. Desenho experimental e procedimento cirúrgico.....	56
4.3. Critérios utilizados na avaliação clínica.....	61
4.4. Escaneamento por microtomografia computadorizada.....	61
4.5. Análise das imagens por microtomografia.....	62
4.6. Análise estatística.....	62
5. Resultados.....	64
6. Discussão.....	77
7. Conclusões.....	87
Referências bibliográficas.....	90
Anexo.....	104
Apêndice.....	106

1. Introdução

1. Introdução

Os bisfosfonatos (BFs), análogos sintéticos dos pirofosfatos inorgânicos, são utilizados, com poucos efeitos adversos, em pacientes com doenças malignas, com osteoporose e outras doenças reabsortivas. A osteonecrose induzida por bisfosfonatos (BRONJ) é a complicação mais grave da terapia com o BF e se apresenta clinicamente como uma exposição do osso alveolar que ocorre espontaneamente ou após um procedimento cirúrgico (Leite *et al.*; 2006; Marx, 2003; Ruggiero *et al.*, 2004). O mecanismo pelo qual os bisfosfonatos causam osteonecrose ainda é incerto, mas há crescente evidência sobre o papel da droga na indução de uma alteração na remodelação óssea fisiológica e na cicatrização das feridas (Kumar *et al.*, 2010; Ruggiero, 2011). Weinstein *et al.* (2009) mostraram evidências que os bisfosfonatos podem prolongar a vida dos osteoclastos e retardar a apoptose, enquanto que outro estudo demonstrou evidências do papel da inflamação local na iniciação da osteonecrose (Lesclous *et al.*, 2009). Landesberg *et al.* (2008) verificaram que os bisfosfonatos inibem a proliferação de células da mucosa bucal e alteram o processo de cura. Scheper *et al.* (2009) também obtiveram resultados semelhantes e concluíram em seu trabalho que o ácido zoledrônico tem efeitos deletérios nos fibroblastos gengivais e em queratinócitos.

A BRONJ foi definida pela Associação Americana de Cirurgiões Buco-maxilofaciais (AAOMS) como sendo uma área de osso exposto na região maxilofacial que não se cura dentro de oito semanas, em um paciente com exposição a um bisfosfonato e sem histórico de radioterapia na região craniofacial (AAOMS).

Estimativas da incidência cumulativa da osteonecrose são limitadas e pouco estudadas, mas entre os pacientes tratados com infusões intravenosas de bisfosfonatos

parece variar entre 0,8 e 12% (Ruggiero *et al.*, 2009). A BRONJ não é gênero específica e pode ocorrer na maxila, mandíbula ou em ambas (Woo *et al.*, 2006). A incidência nos pacientes que fazem uso da forma oral do medicamento também ainda não está clara mas pode estar na faixa de 0,7 casos por 100.000 pessoas ao ano (Ruggiero *et al.*, 2007; Ruggiero *et al.*, 2009).

O fator de risco mais importante no desenvolvimento da BRONJ é a manipulação cirúrgica na cavidade oral, principalmente, as extrações dentárias. Kyrgidis *et al.* (2008) relataram um estudo caso-controle, em que a extração do dente durante o tratamento com bisfosfonato aumentou significativamente a chance (odds ratio: 16,4) de desenvolver osteonecrose.

Os aspectos radiográficos da BRONJ 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 a tomografia computadorizada (TC) por ser significativamente mais sensível a alterações da mineralização óssea e por oferecer melhor resolução de imagem (Arce *et al.*, 2009; Chiandussi *et al.*, 2006; Treister *et al.*, 2010).

Os modelos animais para o estudo da BRONJ 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 animais têm sido propostos (Abtahi *et al.*, 2012; Aghaloo *et al.*, 2011; Allen & Burr, 2008; Allen *et al.*, 2010; 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; Lopéz-Jornet *et al.*, 2010; Marino *et al.*, 2012; Pautke *et al.*, 2012; Perilli *et al.*, 2010; Senel *et al.*, 2010; Sonis *et al.*, 2009). O

trabalho de Pautke *et al.* (2012) avaliou a relação da BRONJ em animais que tiveram dentes extraídos e concluiu que o uso do bisfosfonato induziu a osteonecrose.

A microtomografia computadorizada (microTC) pode produzir uma imagem até 1.000.000 de vezes menor 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 em ratos e em sua avaliação por meio da microTC observou esclerose óssea, sequestro e osso alveolar avascular e radiopaco. Já no experimento de Aghaloo *et al.* (2011) a microtomografia computadorizada revelou osteonecrose com presença de sequestros ósseos e extensiva formação óssea alveolar periosteal nas regiões de periodontite induzida por ligadura nos animais tratados com bisfosfonato.

Existem poucos modelos animais de BRONJ relatados na literatura e observa-se que estes demonstram significativas diferenças metodológicas, incluindo a utilização de diferentes medicações, em diferentes doses e em animais distintos. Além disso, os estudos em animais que avaliaram especificamente as alterações imagenológicas associadas à BRONJ são escassos. Ante as incertezas apresentadas, este estudo propôs desenvolver um modelo animal para o estudo da BRONJ, em ratos submetidos à extração dentária e em uso de bisfosfonato, utilizando a microtomografia computadorizada *in vivo*.

2. Revisão da literatura

2. Revisão da literatura

2.1. Os bisfosfonatos como inibidores de reabsorção óssea

No início dos anos 60, foi descoberto que o pirofosfato inorgânico, um composto encontrado naturalmente, inibia a calcificação de fluidos corporais pela sua ligação aos cristais de hidroxiapatita. Foi observado ainda que as formas orais de pirofosfatos inorgânicos eram inativadas pelas pirofosfatases secretadas pela mucosa gastrointestinal. E, na pesquisa por análogos mais estáveis, o difosfonato (agora denominado bisfosfonato ou bifosfonato) foi a medicação divulgada em sua substituição. Desta forma, os bisfosfonatos mostraram-se vantajosos pois toleravam bem a via oral sem serem inativados e mantinham a desejável função de inibição da dissolução dos cristais de hidroxiapatita (Gutta & Louis, 2007).

2.2. Estrutura química dos bisfosfonatos

Nos seres humanos, o pirofosfato inorgânico é liberado como um subproduto de muitas reações sintéticas do corpo e assim pode ser facilmente detectada em muitos tecidos, incluindo o sangue e a urina. Os BFs são derivados quimicamente estáveis do pirofosfato inorgânico, onde dois grupos fosfato estão ligados por esterificação (cadeias R1 e R2) à cadeia principal (Figura 1). A cadeia curta denominada R1 confere a farmacocinética da droga e a cadeia mais longa designada R2 determina a potência do BF. A capacidade de reabsorção da molécula pode ser aumentada com a adição de uma

cadeia contendo nitrogênio ou um grupo amino na cadeia R2 (Ganapathy et al, 2012; Gutta & Louis, 2007; Janovská, 2012).

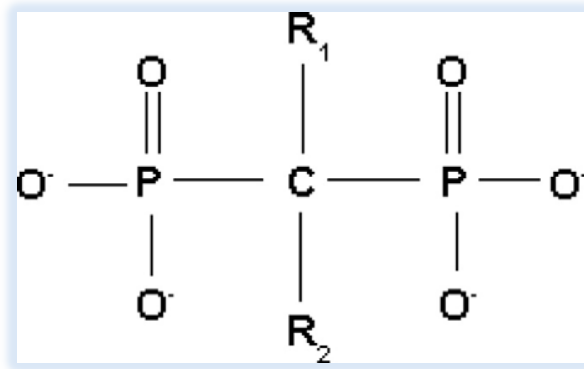


Figura 1. Estrutura química básica dos bisfosfonatos (Gutta & Louis, 2007)

2.3. Farmacologia dos bisfosfonatos

Os BFs podem ser administrados por via oral ou endovenosa. Os BFs endovenosos apresentam alta seletividade óssea, alta deposição óssea e uma biodisponibilidade de aproximadamente 50%. Já os BFs orais possuem uma baixa absorção pelo trato gastrointestinal, têm uma biodisponibilidade que pode ser menor que 1% em sua maioria e, uma vez na corrente sanguínea, desaparecem rapidamente em direção aos tecidos ósseos. O BF, uma vez depositado no osso, somente é eliminado no processo de destruição óssea decorrente da remodelação óssea. A meia-vida esquelética do BF em humanos é bastante variável e pode ocorrer desde três meses até dez anos após a sua administração (Gutta & Louis, 2007; Janovská, 2012).

2.4. Tipos de bisfosfonatos e apresentações farmacológicas

De acordo com a presença ou ausência de um átomo de nitrogênio na cadeia R2, os BFs são divididos em dois grandes grupos: nitrogenados e não-nitrogenados, diferindo-se também o mecanismo de ação dos osteoclastos (Quadro 1). Cada BF apresenta uma potência relativa e uma afinidade óssea diferente e, dentro deste contexto, os BFs nitrogenados são mais amplamente utilizados por possuírem uma maior seletividade óssea. O zolendronato é o BF mais potente na inibição da reabsorção óssea (Janovská, 2012).

Quadro 1 – Classificação, princípio ativo, nome comercial e dose usual dos BFs

Tipo de BF	Princípio Ativo	Nome Comercial (Laboratório)	Apresentação farmacêutica. Indicação. Dose usual
BFs não-nitrogenados	Clodronato	Bonefós (Bayer)	Clodronato dissódico. Reabsorção óssea por doenças malignas. Frasco com 30 cápsulas de 400 mg ou cartucho com 5 ampolas de 5 ml com 300 mg ou cartucho com 1 ampola de 25 ml com 60 mg/ml.
BFs nitrogenados	Pamidronato	Fauldpami (Libbs)	Pamidronato sódico. Inibidor de reabsorção óssea. Frasco ampola de 90 mg. Infusão de 90mg por duas horas.
		Pamidron (Cristália)	Pamidronato dissódico. Inibidor de absorção óssea. Embalagem com 5 ou 10 frascos-ampolas de 60 ou 90 mg. Infusão de 60 ou 90 mg por duas horas.
		Pamidronato dissódico (Eurofarma)	Pamidronato dissódico. Inibidor de reabsorção óssea. Embalagem com 2 frascos-ampolas de 30 mg ou 1 frasco-ampola de 60 ou 90 mg. Infusão de 30, 60 ou 90 mg.
	Alendronato	Alendil (Farmoquímica)	Alendronato. Osteoporose. Embalagens com 4, 8 ou 12 comprimidos de 70mg. Via oral, uma vez por semana.
		Alendil Cálcio D (Farmoquímica)	Alendronato sódico triidratado, carbonato de cálcio de ostras, vitamina D3. Osteoporose. Cartela com 4 comprimidos com 70 mg de ácido alendrônico e frascos com 30 ou 60 comprimidos revestidos com 1.250 mg de carbonato de cálcio e 200 UI de vitamina D3. Via oral, 70 mg uma vez por semana.
		Alendronato de sódio (Germed)	Alendronato de sódio. Inibidor de reabsorção óssea. Embalagens com 2 e 4 comprimidos de 70 mg. Via oral, 70 mg uma vez por semana.
		Alendronato de sódio (Sandoz)	Alendronato de sódio. Inibidor de reabsorção óssea. Embalagens com 4 e 8 comprimidos revestidos de 70 mg. Via oral, 70 mg uma vez por semana.

Tipo de BF	Princípio Ativo	Nome Comercial (Laboratório)	Apresentação farmacêutica. Indicação. Dose usual
BFs nitrogenados	Alendronato	Bonalen (União Química)	Alendronato de sódio. Regulador do cálcio. Embalagem com 4 comprimidos de 70 mg ou 30 comprimidos de 10 mg. Via oral, 70 mg uma vez por semana ou 10 mg uma vez ao dia.
		Boneprev	Alendronato de sódio. Inibidor de reabsorção óssea. Embalagens com 4 comprimidos revestidos de 70 mg. Via oral, 70 mg uma vez por semana.
		Cleveron (TRB Pharma)	Alendronato de sódio. Inibidor de reabsorção óssea. Caixas com 15 e 30 comprimidos de 10 mg. Via oral, uma vez ao dia.
		Endronax (Abbott)	Alendronato de sódio. Osteoporose. Caixa com 4 comprimidos de 70 mg. Via oral, 70 mg uma vez por semana.
		Fosamax (MSD)	Alendronato sódico. Osteoporose pós menopausa. Caixa com 4 comprimidos de 70 mg. Via oral, 70 mg uma vez por semana.
		Fosamax D (MSD)	Alendronato. Inibidor de reabsorção óssea. Caixa com 4 comprimidos de 70 mg. Via oral, 70 mg uma vez por semana.
		Minusorb (UCI-Farma)	Alendronato de sódio. Osteoporose. Cartucho contendo 15 ou 30 comprimidos de 10 mg ou cartucho com 4 comprimidos de 70 mg. Via oral. 10 mg uma vez ao dia ou 70 mg uma vez por semana.
		Ossomax (Gallia)	Alendronato. Osteoporose pós menopausa. Caixa com 4 comprimidos de 70 mg. Via oral, 70 mg uma vez por semana.
		Ostenan (Marjan Farma)	Alendronato de sódio. Inibidor de reabsorção óssea. Caixa com 2 ou 4 comprimidos revestidos de 70 mg. Via oral, 70 mg uma vez por semana.
		Osteofar 70 mg (Elofar)	Alendronato sódico. Osteoporose pós menopausa. Comprimidos de 70 mg. Via oral, 70 mg uma vez por semana.
		Osteoform (Sigma Pharma)	Alendronato. Osteoporose. Caixas com 2, 4, 8 e 70 comprimidos de 70 mg. Via oral, 70 mg uma vez por semana.
	Risedronato	Actonel 150 mg (Sanofi Aventis)	Risedronato sódico. Osteoporose. Caixa com 1 comprimido de 150 mg. Via oral, uma vez ao mês.
		Actonel 35 mg (Sanofi Aventis)	Risedronato. Inibidor do catabolismo ósseo. Caixa com 2 e 4 comprimidos revestidos de 35 mg. Via oral, uma vez por semana.
		Osteotrat (Aché)	Risedronato sódico. Prevenção e tratamento da osteoporose. Caixa com 2 e 4 comprimidos revestidos de 35 mg. Via oral, uma vez por semana.
		Risedross (Sigma Pharma)	Risedronato sódico. Inibidor de reabsorção óssea. Caixa com 2 e 4 comprimidos revestidos de 35 mg. Via oral, uma vez por semana.
	Ibandronato	Bonviva (Roche)	Ibandronato de sódio. Inibidor de reabsorção óssea. Caixa com 1 comprimido revestido de 150 mg. Via oral, uma vez ao mês.
		Bonviva IV (Roche)	Ibandronato de sódio. Osteoporose pós-menopausa. Caixa com 1 seringa preenchida com 3mg/3ml. Infusão de 6mg por uma hora ou infusão de 3mg a cada três meses.

Tipo de BF	Princípio Ativo	Nome Comercial (Laboratório)	Apresentação farmacêutica. Indicação. Dose usual
BFs nitrogenados	Ibandronato	Osteoban (Aché)	Ibandronato de sódio. Osteoporose. Embalagem com com 1 comprimido revestido de 150 mg. Via oral, uma vez ao mês.
	Zoledronato	Ácido Zoledrônico (Eurofarma)	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 (Novartis)	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. Hipercalcemia 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. Hipercalcemia induzida por tumores. Frasco de 5 ml com 4 mg para infusão IV. Infusão de 5 mg, uma vez ao mês.

*Adaptado de Janokská (2012); Papapetrou (2009); Dicionário de especialidades farmacêuticas (2012).

2.5. Mecanismo de ação dos bisfosfonatos

O BF inibe a reabsorção óssea osteoclástica por meio de um mecanismo distinto de outros agentes anti-reabsortivos. A inibição da reabsorção óssea é alcançada por meio: de uma forte ligação do BF com o mineral hidroxiapatita encontrada no osso, da captação do BF pelos osteoclastos durante a reabsorção óssea e da inibição da função dos osteoclastos ou da indução de osteoclastos à apoptose. A redução da reabsorção óssea resulta em melhoria na densidade mineral óssea e redução das taxas de fraturas (Orozco *et al.*, 2012).

Os BFs têm a capacidade de se ligar a íons bivalentes, como Ca^{2+} e, por este motivo, são rapidamente eliminados da circulação e absorvidos em superfícies minerais ósseas ativas com reabsorção óssea osteoclástica. Este fator resulta em uma absorção eficaz dos bisfosfonatos pelos osteoclastos por endocitose e explica a sua ação seletiva

sobre estas células. Outras células que internalizam os bisfosfonatos por endocitose são os osteoblastos, macrófagos, células endoteliais, células epiteliais, monócitos circulantes e as células neoplásicas oriundas de tumores de próstata e de mieloma múltiplo. (Papapetrou, 2009)

A primeira geração dos BFs, ou seja, os BFs não-nitrogenados como o clodronato e o etidronato, são metabolizados intracelularmente por análogos da adenosina trifosfato (ATP). Os metabólitos desta reação inibem a reabsorção óssea dos osteoclastos por meio da indução da apoptose, provavelmente pela inibição de enzimas ATP-dependentes. Em oposição, os BFs nitrogenados como o pamidronato, alendronato, risedronato, ibandronato e o ácido zoledrônico não são metabolizados por análogos da ATP. Estes BFs inibem a síntese da farnesil-difosfato (FPP), uma enzima chave da via do mevalonato. Esta inibição, entre outras alterações bioquímicas complexas, levam à acumulação intracelular de isopentenil-difosfato (IPP). A inibição da síntese da FPP impede a prenilação de GTPases pequenas. As GTPases pequenas preniladas são proteínas de sinalização importantes e esta inibição da prenilação destas proteínas afeta uma variedade de funções celulares. A inibição de osteoclastos pelos BFs nitrogenados é muito provavelmente mediada por sua ação sobre a síntese da FPP, que leva à apoptose prolongada destas células gigantes (Papapetrou, 2009).

2.6. Aplicações clínicas e efeitos adversos dos bisfosfonatos

Os BFs estão indicados na prevenção de complicações associadas a doenças ósseas metastáticas, osteoporose, doença de Paget, osteogênese imperfeita,

hiperparatireoidismo primário ou secundário e outras condições que apresentam fragilidade óssea (Janovská, 2012; Ruggiero, 2011).

A metástase óssea para o esqueleto axial, pelve, fêmur e costelas é uma ocorrência comum em vários tipos de tumores malignos. O principal mecanismo responsável pela osteólise nestes pacientes é a reabsorção excessiva do osso pelos osteoclastos. As células cancerosas que têm metástase para os ossos produzem uma variedade de citocinas, como as interleucinas, as prostaglandinas, o peptídeo relacionado ao hormônio da paratireóide e o fator de necrose tumoral. Estes agentes podem estimular os osteoclastos a reabsorver osso de forma descontrolada e resultar em destruição esquelética (Ruggiero, 2011).

A osteopenia e a osteoporose são doenças resultantes do desequilíbrio da remodelação óssea. A função e a atividade dos osteoblastos e dos osteócitos são moduladas pelos hormônios sexuais, por uma variedade de citocinas e pelo estresse mecânico fisiológico. Mudanças ocorridas com o incremento da idade no nível de atividade física e na quantidade de hormônios sexuais resultam em um aumento no número de osteoclastos e de locais de reabsorção óssea. Esta reabsorção acaba por superar a produção de osso novo pelos osteoblastos que culmina na diminuição geral da massa óssea e da força dos ossos (Ruggiero, 2011).

A patofisiologia da doença de Paget também está centrada no desequilíbrio da remodelação óssea em que a reabsorção por parte dos osteoclastos é aumentada. Isto ocorre devido a uma hiperplasia dos osteoclastos combinada a um aumento global na atividade da reabsorção óssea osteoclástica. Frente a esta situação, a resposta do osteoblasto é a de aumentar a formação de osso, mas esta resposta acaba por ser inadequada e desorganizada, o que resulta num esqueleto fraco e estruturalmente alterado (Ruggiero, 2011).

Os efeitos adversos dos BFs orais incluem irritação do trato gastro-intestinal superior e câncer no esôfago. Já nos endovenosos uma resposta de fase aguda, que é uma alteração que se assemelha a uma gripe, pode estar presente em pacientes que estão recebendo as suas primeiras doses. Outros efeitos como a fibrilação atrial, inflamações oculares, severas dores músculo-esqueléticas, insuficiência renal, hipocalcemia e a osteonecrose maxilomandibular relacionada a bisfosfonatos foram observadas em ambas as formas de administração da medicação. A BRONJ é o efeito adverso mais grave da terapia com BFs (Janovská, 2012; Orozco & Maalouf, 2012; Pazianas & Abrahamsen, 2011; Walter *et al.*, 2007).

Em geral, para os pacientes em tratamento de osteoporose, os riscos associados à utilização dos BFs são significativamente mais baixos do que a incidência de fratura de quadril em pacientes não tratados. Com base no entendimento atual dos efeitos colaterais associados aos BFs e dos benefícios significativos de sua terapia na prevenção primária e secundária de fraturas, deve-se continuar a tratar pacientes com osteoporose com BFs, mantendo-se cauteloso e reavaliando a necessidade da continuidade da terapia por mais de três a cinco anos. Da mesma forma, para os pacientes que fazem uso da medicação endovenosa, justifica-se a sua prescrição por seu incremento na qualidade de vida e por retardar os efeitos adversos esqueléticos de tumores ósseos metastáticos (Orozco & Maalouf, 2012; Pazianas & Abrahamsen, 2011).

2.7. BRONJ: definição e nomenclaturas

Apesar dos claros benefícios advindos da utilização dos BFs, a BRONJ emergiu a partir dos relatos de Marx em 2003, como uma complicação significativa em um subgrupo

de pacientes que receberam este medicamento. A BRONJ é um achado decorrente da terapia com BFs e que se apresenta de forma isolada na região maxilomandibular (Marx, 2003; Ruggiero, 2011).

A padronização dos critérios diagnósticos, assim como a nomenclatura para esta entidade clínica é de grande importância por facilitar futuras pesquisas clínicas e epidemiológicas. E, neste sentido, uma definição uniforme para a BRONJ serve para distinguir esta nova entidade clínica de outras condições intraorais que promovem um atraso no reparo. Na literatura, várias siglas são utilizadas para esta condição, tais como: BRONJ (bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw - osteonecrose maxilomandibular relacionada a bisfosfonatos), BRON (bisphosphonate-related osteonecrosis - osteonecrose relacionada aos bisfosfonatos), BON (bisphosphonate osteonecrosis - osteonecrose por bisfosfonato), BAONJ (bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw - osteonecrose maxilomandibular associada ao bisfosfonato) e ONJ (osteonecrosis of the jaw - osteonecrose maxilomandibular). Apesar desta grande variedade, o termo BRONJ ainda permanece como o termo de uso mais consagrado na literatura mundial (Ruggiero, 2013). Ainda no que se refere à nomenclatura da doença, o surgimento de necrose em pacientes que não fazem tratamento com BFs mas que utilizam inibidores da RANKL, pode vir a exigir uma modificação desta nomenclatura no futuro próximo. A ADA (Associação Americana de Odontologia) introduziu, recentemente, o termo ARAONJ (antiresorptive associated osteonecrosis of the jaw – osteonecrose maxilomandibular associada a antirreabsortivo) para incluir os novos casos de necrose associados com a terapia monoclonal (Aghaloo *et al.*, 2010; Ruggiero, 2013).

A Associação Americana de Cirurgiões Buco-maxilo-faciais (AAOMS) estabeleceu uma definição para a BRONJ que se mantém inalterada desde a sua primeira definição em 2006. Os princípios do diagnóstico incluem: histórico de utilização de bisfosfonatos,

osso exposto no interior da cavidade oral e ausência de terapia com radiação na região maxilofacial. Assim sendo, apesar das variações de nomenclatura, a descoberta clínica do osso exposto e de necrótico permanece como a marca consistente do diagnóstico e, o exame físico, por conseguinte, é o método mais eficaz para estabelecer o diagnóstico da BRONJ (Aghaloo *et al.*, 2010; Ruggiero, 2013).

2.8. Incidência e Prevalência da BRONJ

A estimativa da incidência da BRONJ está limitada a estudos retrospectivos com tamanhos de amostra limitada. A dificuldade atual para estabelecer os dados exatos da incidência decorre de vários fatores incluindo a definição não padronizada e as inconsistências no reconhecimento de casos. Com esse entendimento, a estimativa da incidência cumulativa da BRONJ em pacientes que receberam BF por via intravenosa para o tratamento de doenças malignas varia de 0,8% à 12% (Ruggiero *et al.*, 2009).

Já nos pacientes medicados com BF oral, a incidência parece ser significativamente menor e, segundo a Merck, fabricante do alendronato, a incidência da BRONJ é de 0,7 casos por 100.000 pessoas/ano. Este dado foi obtido a partir do número de casos notificados de osteonecrose dividido pelo número de comprimidos de alendronato prescritos desde a aprovação da droga. No entanto, uma vez que estes casos não foram confirmados, pode haver sérios problemas com esta metodologia (Ruggiero *et al.*, 2009).

Em um estudo realizado na Austrália, que tinha como base os dados de prescrição da medicação, a frequência estimada de osteonecrose em pacientes tratados com

alendronato semanal foi de 0,01 a 0,04%. Os pacientes que tinham sido submetidos à extração tinham uma frequência aumentada para 0,09 a 0,34% (Mavrokokki *et al.*, 2007).

A prevalência da BRONJ foi avaliada por Walter *et al.* (2007) em estudo retrospectivo que compreendia os pacientes atendidos no Departamento de Cirurgia Maxilo-facial da Universidade de Mainz, Alemanha, no período de 2000 a 2005. O estudo encontrou osteonecrose em 10% dos pacientes medicados com BFs e, destes, 76% reportaram alterações odontológicas como extração dental, prótese desajustada e doença periodontal prévias ao desenvolvimento da doença.

Rugani *et al.* (2013) realizaram estudo randomizado e controlado que tinha como objetivo investigar a prevalência da osteonecrose em pacientes com câncer de mama. Os resultados demonstraram que 10,4% das pacientes apresentavam fístulas e sinais radiográficos compatíveis com a osteonecrose estágio 0 (zero). Nenhuma paciente apresentava osteonecrose em estádios avançados da doença.

2.9. Fisiopatologia da BRONJ

Os estudos da BRONJ nos últimos dez anos proporcionaram uma boa descrição desta doença, no entanto a sua patogênese ainda é pouco conhecida. Quatro hipóteses principais têm sido propostas para explicar a etiologia desta alteração e incluem a supressão da remodelação óssea (mediada por osteoclastos), as alterações da vascularização óssea (anti-angiogênese), a toxicidade sobre a mucosa local e os fatores genéticos (Ruggiero, 2013).

A hipótese prevalente e mais estudada indica a alteração induzida pela droga na remodelação fisiológica e na cicatrização das feridas como o principal mecanismo de

indução da doença. A profunda inibição da função osteoclástica inibe a remodelação óssea fisiológica a tal ponto que os microdanos locais da carga mecânica normal ou daqueles provocados (extração dentária) não podem ser reparados. E isso pode, em último caso, resultar em necrose óssea (Ruggiero, 2011). Os recentes relatos de necrose da mandíbula em pacientes que receberam Denosumab, um anticorpo monoclonal que tem como alvo os osteoclastos por um mecanismo completamente diferente dos BFs, corrobora a hipótese de que inibição dos osteoclastos pode ser o evento primário na patogênese desta complicação (Aghaloo *et al.*, 2010; Stopeck *et al.*, 2009).

Outro fator importante a ser considerado é a propriedade anti-angiogênica de determinados BFs. O ácido zoledrônico tem demonstrado exercer um efeito inibidor sobre os níveis de fator de crescimento endotelial vascular (um potente estimulador da angiogênese) circulante (Weinstein *et al.*, 2009; Wood *et al.*, 2002). Estas propriedades aparentemente afetam a irrigação sanguínea do osso ou podem operar em conjunto com as alterações metabólicas mediadas pela supressão osteoclástica para então resultar na necrose dos ossos maxilares e mandibulares (Ruggiero, 2011).

Outros estudos focaram na resposta de tecido mole e demonstraram que os BFs podem ser diretamente tóxicos à mucosa oral, o que pode resultar em fenestrações da mucosa e exposição de osso (Sarasquete *et al.*, 2008). Como apenas uma minoria de pacientes que utilizam o BF desenvolvem a necrose óssea é também possível que as variações genéticas individuais no metabolismo da droga ou a homeostase óssea possam conferir suscetibilidade ou resistência ao desenvolvimento da osteonecrose (Landesberg *et al.*, 2008). Essas teorias e suposições precisam ser validadas por pesquisas científicas básicas e clínicas baseadas em evidências (Ruggiero, 2011).

O aparente envolvimento seletivo pela maxila e mandíbula pode ser decorrente de um ambiente único presente na cavidade oral. Normalmente, a cicatrização de feridas

ósseas abertas (como ocorre nas extrações) na presença da microflora oral normal, ocorre de forma rápida e sem complicações. Contudo, quando o potencial de cicatrização da mandíbula ou da maxila é comprometido ou por exposição de radiação para eliminação de tumores, ou por algum agente patológico, ou ainda, por um processo patológico, a mais diminuta lesão ou doença nestes locais aumenta o risco de osteonecrose e de osteomielite secundária. Além disso, os BFs são preferencialmente depositados nos ossos que apresentam altas taxas de remodelação, e, já que a maxila e a mandíbula são os locais de maior remodelação óssea dentro do esqueleto, é possível que os níveis de BF nestes ossos estejam particularmente aumentados. Até o presente momento, não existem relatos de necrose óssea por uso de BFs em ossos fora do esqueleto craniofacial (Ruggiero, 2011; Ruggiero, 2013).

2.10. Fatores de risco para a BRONJ

Os principais fatores de risco associados à BRONJ compreendem questões relacionadas com a droga (a potência e a duração da exposição), fatores de risco locais (cirurgia dentoalveolar), anatomia local, doença bucal e sistêmica concomitante, fatores demográficos e fatores genéticos. No entanto, apenas três fatores de risco mantiveram-se constantes ao longo da maioria dos estudos clínicos. Na maioria dos casos de BRONJ relatados até o momento, o trauma dentoalveolar recente foi o fator de risco mais prevalente e consistente (Badros *et al.*, 2006; Barasch *et al.*, 2011; Marx *et al.*, 2005). A duração da terapia com BFs também parece estar fortemente relacionada à probabilidade de desenvolvimento de necrose e, além disso, maior número de esquemas de tratamento está associado a maior risco de desenvolver a doença (Badros *et al.*, 2006; Hoff *et al.*,

2006). Os BFs endovenosos mais potentes que são administrados em esquema mensal, como o Ácido Zoledrônico e o Pamidronato, são significativamente mais problemáticos, em comparação a outros BFs (Ruggiero, 2013).

Os testes que visam avaliar o risco de desenvolver a BRONJ medindo as flutuações dos marcadores de remodelação óssea têm se mostrado controversos e pouco confiáveis (Bagan *et al.*, 2008; Fleisher *et al.*, 2010; Kunchur *et al.*, 2009; Kwon *et al.*, 2009; Marx *et al.*, 2007). Estes estudos baseiam-se no conhecimento que os marcadores de remodelação óssea aumentam poucos meses após a suspensão do uso de BFs orais, sugerindo assim que a função dos osteoclastos e a remodelação óssea foram normalizadas (Rosen *et al.*, 1998; Rosen *et al.*, 2000). Estes marcadores, todavia, representam um reflexo do total da remodelação óssea em todo o esqueleto e não são específicos para a maxila ou mandíbula, onde suspeita-se que a taxa de remodelação óssea seja mais severamente deprimida na exposição prolongada por BFs. Do ponto de vista mais prático, o uso de marcadores de remodelação óssea para estimar o nível de supressão desta remodelação só é significativo quando comparado com os níveis pré-tratamento e, estes níveis, raramente são obtidos na prática clínica. Além disso, o uso dos níveis de marcadores de reabsorção óssea para avaliar o risco BRONJ pode ser enganosa para o pequeno grupo de pacientes que desenvolvem osteoporose apesar de apresentarem níveis normais de referência de marcadores de reabsorção óssea (Ruggiero, 2013).

2.11. Sinais clínicos, sintomas e diagnóstico diferencial da BRONJ

O diagnóstico diferencial da BRONJ deve, primeiramente, excluir outras condições clínicas como a alveolite, a sinusite, a gengivite/periodontite, a patologia periapical e os distúrbios da articulação têmporomandibular. Naquelas raras situações onde o osso exposto está presente em pacientes que fazem uso de BFs e que também realizam terapia com radiação na região maxilomandibular, a osteorradionecrose deve ser fortemente considerada. Embora a inflamação e a infecção óssea estejam tipicamente presentes em pacientes com BRONJ em estágio avançado, este é um evento secundário onde o osso exposto e o tecido mole ao seu redor tornam-se infectados, apresentando um quadro clínico que é semelhante à osteomielite. A análise histológica destas peças ósseas dificilmente oferece os critérios necessários para estabelecer um diagnóstico de osteomielite aguda ou crônica. As análises das propriedades físicas do osso necrótico ressecado também não demonstram quaisquer características únicas que serviriam como um biomarcador de confiança para essa doença (Allen & Ruggiero, 2009; Allen *et al.*, 2010; Ruggiero, 2013).

O histórico do paciente e o exame clínico continuam sendo as ferramentas de diagnóstico mais sensíveis para esta condição. As áreas de osso exposto e necróticas podem permanecer assintomáticas por semanas, meses ou mesmo anos. Estas lesões são mais frequentemente sintomáticas quando os tecidos circundantes ficam inflamados ou quando há evidência clínica de osso exposto. Os sinais e sintomas que podem preceder o desenvolvimento da BRONJ clinicamente detectável incluem dor, mobilidade dentária, inchaço da mucosa, eritema e ulceração. Estes sintomas podem ocorrer de forma espontânea, ou, mais comumente, no local da cirurgia dental prévia. A maioria das séries de casos descreve a BRONJ em regiões de cirurgia dentária anterior (ou seja,

locais de extração), no entanto, a exposição óssea também tem sido relatada em pacientes sem história de trauma ou em regiões desdentadas. As fístulas intra e extra-orais podem se desenvolver quando o osso necrosado torna-se secundariamente infectado. Alguns pacientes queixam-se de alteração na sensibilidade da área afetada, onde, aparentemente, o feixe neurovascular é pressionado pelo processo inflamatório do osso circundante. A sinusite crônica, que também é secundária à osteonecrose, pode apresentar fístula oro-antral ou não, e pode ser um sintoma que caracteriza o envolvimento ósseo maxilar (Ruggiero, 2013).

Observa-se que as lesões são encontradas com maior frequência na mandíbula do que na maxila (razão 2:1). São também mais prevalentes em áreas com finas mucosas sobrepostas a proeminências ósseas como em toros, exostoses e na linha milo-hióidea (Marx *et al.*, 2005; Ruggiero *et al.*, 2004; Ruggiero *et al.*, 2006). O tamanho da área afetada é incerto e pode variar desde um alvéolo não cicatrizado até uma grande seção de exposição e necrose maxilar ou mandibular. A cultura microbiana nas áreas de osso exposto geralmente mostram microflora oral dentro dos padrões de normalidade e, portanto, nem sempre são úteis. No entanto, nos casos onde existe um grande envolvimento dos tecidos moles, os dados da cultura microbiana podem definir, por meio das comorbidades das infecções orais, o regime antibiótico mais apropriado para o tratamento (Ruggiero, 2013).

2.12. Estadiamento da BRONJ

Um sistema de estadiamento clínico foi desenvolvido por Ruggiero *et al.* (2006) e então adotado pela AAOMS. Este sistema além de classificar os pacientes com BRONJ,

oferece diretrizes para a escolha do tratamento e recolhe dados para avaliar o prognóstico e o resultado do tratamento em pacientes que usaram o BF intravenoso ou BF oral (Quadro 2) (Ruggiero, 2013).

Os pacientes sem evidência de osso exposto ou necrótico são considerados "em risco" se eles tiverem sido expostos a BFs orais ou endovenosos. Pacientes no Estádio 1 apresentam exposição óssea, são assintomáticos e não possuem evidência de edema ou infecção no tecido mole adjacente significativos. Estes pacientes podem ter sintomas de dor antes do desenvolvimento de alterações radiológicas suspeitas de osteonecrose ou da evidência clínica de osso exposto (Ruggiero, 2013).

O Estádio 2 é caracterizado por exposição óssea associada à dor, edema nos tecidos moles adjacentes ou infecção secundária. Pacientes no Estádio 3 da doença, apresentam exposição óssea associada à dor, edema inflamatório do tecido mole adjacente ou infecção secundária e, além disso, podem exibir fratura patológica, fístula extraoral ou evidência radiográfica de osteólise que se estende até a borda inferior da mandíbula ou do assoalho do seio maxilar (Ruggiero, 2013).

Desde a publicação das orientações iniciais de tratamento em 2006, relatos de sinais e sintomas inespecíficos como dor, formação de abscesso, alteração da função sensorial ou osteosclerose surgiram em pacientes com história de uso de BF, mas sem evidência clínica de necrose. Em um esforço para determinar se estes achados representavam uma doença clínica precursora da BRONJ, a AAOMS atualizou o estadiamento da BRONJ e incluiu estes pacientes em uma nova categoria denominada Estádio 0. A evolução da doença do Estádio 0 até a manifestação da BRONJ permanece indeterminado e representa uma área importante para pesquisas futuras (Ruggiero, 2013).

Quadro 2 - Estadiamento da BRONJ

Estádio	Sinais e sintomas	Tratamento
Em risco	Nenhum osso exposto/necrótico aparente em pacientes que foram tratados com BF oral ou endovenoso	Cuidados odontológicos preventivos com o objetivo de minimizar a chance de exodontia.
Estádio 0	Achados clínicos inespecíficos e sintomas como dor na mandíbula/maxila ou osteosclerose, mas sem evidência clínica de osso exposto.	Cuidados odontológicos preventivos com o objetivo de minimizar a chance de exodontia.
Estádio 1	Osso exposto/necrosado em pacientes assintomáticos e sem nenhuma evidência de infecção	Acompanhamento por 6-8 semanas, bochecho com antibiótico, cuidados odontológicos de rotina, sequestrectomia quando indicada
Estádio 2	Osso exposto/necrótico associado à infecção e evidenciado por meio de eritema e dor na região do osso exposto, com ou sem secreção purulenta.	Bochecho com antibiótico, medicação analgésica, antibioticoterapia sistêmica, sequestrectomia quando indicada
Estádio 3	Osso exposto/necrosado em pacientes com dor, infecção e um ou mais dos seguintes sinais: fratura patológica, fístula extraoral ou osteólise estendendo-se até a borda inferior da mandíbula ou do seio maxilar	Bochecho antibiótico, medicação analgésica, antibioticoterapia sistêmica, debridamento, ressecção cirúrgica.

*Quadro adaptado de Ruggiero (2013).

2.13. Aspectos imagenológicos da BRONJ

As características radiográficas de BRONJ são inespecíficas. Os achados iniciais da osteonecrose incluem esclerose medular focal com pobre diferenciação córticomédular e envolvimento do canal alveolar inferior, que pode ser clinicamente concomitante a um aumento da mobilidade do dente. Um sinal recorrente na osteonecrose é a falta ou o atraso na cicatrização do alvéolo após a extração de um dente. O aumento do espaço do ligamento periodontal, alterações osteolíticas e irregularidades da superfície cortical

também têm sido descritas (Arce *et al.*, 2009; Chiandussi *et al.*, 2006; Guggenberger *et al.*, 2013; Stockmann *et al.*, 2010; Takaishi, 2010 *et al.*; Torres *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2012; Treister *et al.*, 2009; Treister *et al.*, 2010; Van den Wyngaert *et al.*, 2011). Nos estádios mais avançados da doença observa-se a formação de sequestro ósseo, fraturas, reação periosteal/bicorticalização e, no caso de envolvimento da maxila, pode haver espessamento da mucosa do seio com a presença de secreção purulenta ou não (Haworth & Webb, 2012).

A radiografia convencional geralmente não demonstra qualquer anormalidade nas fases iniciais da doença, devido ao baixo grau de descalcificação da lesão nesta fase. Contudo, mesmo em radiografias convencionais, achados como a osteoesclerose localizada ou difusa ou um espessamento da lâmina dura (observáveis no Estádio 0) podem estar presentes e, neste caso, serem preditores de futuros locais de exposição e de necrose óssea (Hutchinson *et al.*, 2010). Pouca ou nenhuma formação óssea em um local de extração anterior também pode representar um sinal radiográfico precoce da BRONJ (Ruggiero, 2013).

Os achados em tomografia computadorizada (TC) também não são específicos, mas é significativamente mais sensível a mudanças na mineralização óssea e é portanto mais indicado para demonstrar áreas de esclerose focal, espessamento da lâmina dura, formação de sequestro ósseo e da presença de osso periosteal reativo. As imagens de TC oferecem também um delineamento mais preciso da extensão da doença, o que pode ser útil para o planejamento de tratamentos cirúrgicos (Arce *et al.*, 2009; Treister *et al.*, 2010).

A cintilografia óssea em pacientes com risco de BRONJ tem recebido crescente atenção depois de relatos de aumento da captação de contraste em regiões onde,

posteriormente, ocorreram o desenvolvimento de BRONJ (Chiandussi *et al.*, 2006; O’Ryan *et al.*, 2009)

Apesar da ressonância magnética apresentar um valor limitado em pacientes com a doença já existente, ela parece ter utilidade como ferramenta de previsão em pacientes com a doença na fase pré-clínica (Estádio 0) e, assim, pode vir a oferecer algum grau de benefício, mas novos estudos são necessários para validar esta ferramenta (Ruggiero, 2013).

Por fim, a frequência e a correlação entre os achados clínicos e de imagem permanecem obscuros. Também não está clara a relação entre os achados de imagem e o avanço da osteonecrose.

2.14. A microtomografia computadorizada na avaliação óssea

Desde a invenção dos raios X por Roentgen em 1895, a evolução tecnológica promoveu uma revolução na medicina diagnóstica, tornando possível a observação do funcionamento interno do corpo de forma não invasiva (Dunn, 2001). A tomografia computadorizada foi desenvolvida na década de 1970 (Hounsfield, 1973) e, desde então, a partir da reconstrução de suas imagens é possível obter resultados tridimensionais. Enquanto os escaneamentos com TC produzem imagens com cerca de de 1 mm^3 em elementos de volume (*voxels*), as tomadas com microtomografia computadorizada (microTC ou μTC) produzem *voxels* na faixa de $5\text{-}50\mu\text{m}$, ou seja, cerca de 1.000.000 de vezes menores em volume do que os *voxels* produzidos pela TC (Feldkamp *et al.*, 1989; Kuhn *et al.*, 1990). Uma vasta gama de amostras pode ser analisada utilizando a

microTC, incluindo tecidos mineralizados como osso e dente e materiais como cerâmica, polímeros e biomateriais. A microTC também pode ser utilizada para tecidos moles, como por exemplo, o tecido pulmonar. Com o desenvolvimento dos equipamentos de microTC imagens *in vivo* de pequenos animais vivos puderam então ser adquiridas (Guldberg *et al.*, 2003; Guldberg *et al.*, 2004).

Além das imagens qualitativas das amostras esqueléticas, a microTC pode obter dados métricos precisos tais como a densidade mineral óssea (DMO), análise do osso cortical e trabecular e o volume de hidroxiapatita em miligramas por unidade de volume (mgHA/cc). O exame possibilita o arquivamento digital das imagens, a aquisição *in vivo* ou *ex vivo*, estudo da imagem em fatias ou em três dimensões e a apresentação dos dados padronizados com a orientação histológica (padrão ou oblíquo). Algumas desvantagens do método incluem aquisições demoradas (principalmente quando em altas resoluções espaciais), grandes tamanhos de arquivo e possível limitação em imagens de estruturas biológicas de alta densidade (por exemplo, osso) (Vasquez *et al.*, 2013).

A microTC utiliza feixes de raios X microfocais e detectores de alta resolução, o que permite projeções rotativas por meio de várias direções para produzir imagens tridimensionais das amostras. Tais imagens representam mapas de distribuição espacial dos coeficientes de atenuação linear determinada pela energia da fonte de raios X e a composição atômica do material da amostra. Uma vez que o processo de gravação não é destrutivo, as características internas da amostra podem ser examinada diversas vezes e, após a digitalização das imagens, as amostras permanecem disponíveis para testes biológicos e mecânicos adicionais (Bentley *et al.*, 2002; Guldberg *et al.*, 2003; Guldberg *et al.*, 2004; Holdsworth & Thornton, 2002; Paulus *et al.*, 2000).

Por estas características, a utilização da microTC *in vivo* em modelos experimentais com animais podem ser úteis na elucidação das principais alterações ósseas da osteonecrose, assim como para avaliar o curso do processo de cicatrização após a exodontia.

2.15. Modelos animais de osteonecrose

Biasotto *et al.* (2010) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar um modelo animal de BRONJ que reproduzisse a condição patológica dos humanos. Cinco ratos *Wistar* receberam ácido zoledrônico, via intravenosa (0,04 mg) uma vez por semana, durante cinco semanas. Depois de duas semanas, os animais foram submetidos à extração de um molar superior e à indução de um defeito ósseo de 4 mm de diâmetro no mesmo local. Depois de sete semanas a partir da extração, os animais foram examinados clinicamente e uma cintilografia óssea foi realizada. Após uma semana, os ratos foram mortos e duas tomografias computadorizadas e a análise histológica foram realizadas. Cinco ratos não tratados com ácido zoledrônico e submetidos ao tratamento cirúrgico foram utilizados como controle. Em sete semanas após a extração, todos os ratos tratados com ácido zoledrônico apresentaram expansão do defeito e exposição óssea. Estas características foram confirmadas pela cintilografia óssea. Os ratos do grupo controle demonstraram epitelização do defeito ósseo e uma captação normal do radiofármaco durante o exame. A tomografia computadorizada revelou a irregularidade da margem e destruição do osso cortical, que não eram evidentes no grupo controle. Na microscopia, as amostras apresentaram necrose óssea, perda de osteócitos e reabsorção

periférica sem infiltrado inflamatório, enquanto os controles apresentaram cicatrização óssea normal.

Ali-Erdem *et al.* (2011) também realizaram experimento com o objetivo de desenvolver um modelo animal que replicasse as condições clínicas e histológicas da BRONJ. Oitenta ratos *Wistar* foram divididos em dois grupos: 40 animais receberam Dexametasona 1mg/kg subcutânea nos dias 7, 14 ou 21 e 1, 2 ou 3 doses de Ácido Zoledrônico 7,5µg/kg subcutânea que era administrada de forma a coincidir com o último dose de dexametasona; os 40 animais restantes faziam parte do grupo controle e receberam soro fisiológico administrado nas mesmas condições do grupo de estudo. Metade dos animais de cada grupo foi submetido à exodontia do molar inferior esquerdo e a outra metade à extração do molar superior esquerdo. 7 animais foram excluídos do estudo pois morreram no período que antecedeu à eutanásia. Os animais foram sacrificados 28 dias após a extração dental. A quantidade de neoformação óssea trabecular diminuiu significativamente no grupo de estudo quando comparado ao grupo-controle ($p=0,0001$). Em ambos os grupos, não foi observada reação de corpo estranho nos alvéolos. Não houve diferença significativa entre os grupos para a presença de fibrose ($p=0,306$). Os escores de necrose e de inflamação foram significativamente maiores no grupo de estudo ($p=0,015$ e $p=0,0001$, respectivamente). Os autores sugeriram novos estudos que utilizem somente bisfosfonato no grupo tratado, assim como o emprego de amostra maior.

Hokugo *et al.* (2010) estudaram a geração de lesões de osteonecrose em ratos, semelhantes às que acontecem em humanos, pela injeção intravenosa de Zoledronato (ZOL, 35 mg/kg a cada duas semanas) e extração de molar superior em ratos com deficiência de vitamina D. A prevalência de osteonecrose no grupo com VitD(-)/ZOL foi de

66,7%, o que foi significativamente maior ($p < 0,05$, teste exato de Fisher) que os outros grupos. O número de osteoclastos aumentou significativamente sobre a superfície do osso alveolar pós-extração do dente no grupo VitD (-)/ZOL, no qual a inflamação foi descrita por microPET/18F. O estudo sugeriu que o mecanismo fisiopatológico subjacente da osteonecrose pode envolver a interação entre bisfosfonatos e funções comprometidas da vitamina D, no domínio da homeostase óssea e da imunidade inata.

Bi *et al.* (2010) desenvolveram um modelo animal que tinha como objetivo de provocar lesões semelhantes à osteonecrose por bisfosfonatos ocorrida em pacientes com mieloma múltiplo, em ratos. Os animais receberam injeções intraperitoniais de Zolendronato (125 µg/kg; duas vezes por semana), Dexametasona (5 mg/kg; uma vez por semana), Docetaxel (25 mg/kg; uma vez por semana), ou as suas combinações, três semanas antes da exodontia. O primeiro molar superior esquerdo e inferior direito foram extraídos. Após a extração as diferentes medicações e suas combinações foram administradas por mais 3 a 12 semanas. Os ratos foram então eutanasiados e avaliados por histoquímica e imunohistoquímica, quantificação do osso necrótico, remodelação óssea, angiogênese óssea e por microtomografia. Os achados do estudo demonstraram que ocorreu a indução de uma lesão em ratos que se assemelhava em suas manifestações clínicas e radiográficas à osteonecrose por bisfosfonatos observada em humanos. Estes aspectos presentes incluíam esclerose óssea, sequestro, osso alveolar avascular e radiodensidade em mandíbula que persistia para além do curso normal da cicatrização após a exodontia. A administração de bisfosfonato por um longo período resultou no aumento do tamanho e do número de osteoclastos e a formação de células gigantes semelhantes ao osteoclasto no osso alveolar. O desenvolvimento de necrose óssea e a cicatrização alterada dos tecidos moles foi dependente da utilização por um

longo período e de doses elevadas do bisfosfonato, do imunossupressor e do quimioterápico, bem como da presença de trauma mecânico.

Huja *et al.* (2011), por outro lado, avaliaram o efeito a curto prazo do Ácido Zoledrônico na remodelação e cicatrização óssea pós exodontia em cachorros. Quatro cães machos receberam 0,1 mg/kg mensal de Acido Zoledrônico por quatro meses e outros quatro animais não receberam nenhuma medicação. Ao término da aplicação da medicação no grupo de estudo, todos animais (grupo e controle) tiveram os terceiros pré-molares superior e inferior extraídos unilateralmente, assim como dois mini-implantes ortodônticos foram instalados em maxila e em mandíbula, ipsilateralmente. O percentual de necrose foi investigado na região de alvéolo e na região basal do osso peri-radicular por meio do lactato-desidrogenase e de parâmetros histomorfométricos dinâmicos que foram quantificados e analisados utilizando modelos mistos. Todas as regiões submetidas à exodontia cicatrizaram sem intercorrências e nenhuma lesão que se assemelhava à osteonecrose foi observada. Menos de 1% dos sítios ósseos examinados apresentava osteonecrose. O Ácido Zoledrônico reduziu a remodelação óssea tanto nas áreas cirúrgicas (região da exodontia e dos mini-implantes) quanto nos sítios não-cirúrgicos. Assim sendo, conclui-se que, apesar da drástica redução na remodelação óssea, o Ácido Zoledrônico não produziu lesões semelhantes à osteonecrose nas áreas submetidas à intervenção cirúrgica quando administrado pelo período de quatro meses em cachorros.

O objetivo do estudo de Senel *et al.* (2010) foi avaliar histologicamente os efeitos do pamidronato e zolendronato na mandíbula em um modelo animal. Sessenta ratas *Sprague-Dawley* foram utilizadas neste estudo. Os animais foram divididos em 6 grupos (10 por grupo): Controle 1 (C1), injetados com solução salina por 6 semanas; Zolendronato-1 (ZA1), injetado com Zolendronato durante 6 semanas; Pamidronato-1

(PA1), injetados com Pamidronato por 6 semanas; controle 2 (C2), injetado com solução salina, durante 8 semanas; Zolendronato-2 (ZA2), injetado com Zolendronato durante 8 semanas, e Pamidronato-2 (PA2), injetado com pamidronato por 8 semanas. Nenhum procedimento odontológico foi realizado nos animais. Os ratos foram mortos dois dias após o término da terapia medicamentosa, e a mandíbula e o fêmur foram avaliados histopatologicamente. A análise histológica revelou a inflamação limitada à mandíbula nos grupos ZA2 e grupos PA2, já a mandíbula e a região anterior do fêmur não foram afetadas. Necrose dos tecidos moles foi evidente em um rato do grupo ZA2. Inflamação óssea específica associada ao uso de bisfosfonatos e alterações de tecido mole foram observadas na mandíbula sugerindo que essas drogas podem alterar o cenário para a cura, associando o desenvolvimento de osteonecrose relacionada aos bisfosfonatos na mandíbula.

Sonis *et al.* (2009) descreveram um modelo animal, desenvolvido em ratas *Sprague-Dawley*, para replicar os achados clínicos, radiográficos e características histológicas descritas nos seres humanos. Animais tratados com uma sequência de Ácido Zoledrônico (ZA) e Dexametasona (DX) durante um período de 1 a 3 semanas desenvolveram alterações semelhantes a osteonecrose (*osteonecrosis-like*) após extração dos molares inferiores ou superiores. Enquanto que os locais de extração de animais controle tiveram cura mais rápida, os animais tratados com ZA/DX demonstraram úlceras cobrindo as áreas de necrose óssea. Em contraste com as imagens dos animais controle, as radiografias de animais tratados com ZA/DX demonstraram má definição do rebordo alveolar com radiodensidade mista. Aumentos modestos na extensão do infiltrado inflamatório foram observados quatorze dias após a extração em animais ZA em relação ao controle ou ZA/DX. Apoptose de células epiteliais não foi observada em nenhum grupo experimental e não houve evidência de presença de microorganismos como o

Actinomyces. A administração da ZA/DX anterior às extrações dentárias em ratos, portanto, resulta no desenvolvimento de alterações do tecido ósseo e tecidos moles que são semelhantes às dos seres humanos que desenvolvem osteonecrose e pode fornecer um modelo útil para o estudo da patogênese da BRONJ.

O estudo de Marino *et al.* (2012) tinha como objetivo desenvolver um modelo previsível de BRONJ em ratos após exodontias. Trinta ratas foram divididas aleatoriamente em dois grupos, controle e experimental. O grupo experimental recebeu duas injeções intravenosas de zolendronato (20 µg/kg). A raiz mesial do primeiro molar inferior direito foi extraída. Os ratos foram sacrificados com 0, 4 e 8 semanas. A densidade mineral óssea (DMO), o colapso do colágeno (piridínio [PYD]), a regeneração vascular (VEGF) e a histologia foram examinados. Foi observada uma tendência para valores mais elevados de PYD no grupo controle em comparação ao grupo de estudo após a extração. O soro para VEGF aumentou significativamente após o ferimento para ambos os grupos experimental e controle. A DMO da região do alvéolo foi significativamente menor no grupo controle em comparação aos ratos tratados com zolendronato. Os cortes histológicos do grupos experimental apresentavam bactérias e necrose óssea. Os resultados encontrados foram consistentes com as características de BRONJ nos seres humanos após o tratamento com Zolendronato.

Pautke *et al.* (2012) também realizaram estudo que objetivava avaliar as alterações da BRONJ após a extração dental. Um total de dez porquinhos Göttingen com dois anos de idade foram divididos em dois grupos. Cinco porcos (Grupo 1) receberam uma dose semanal de 0,05 mg/kg de zolendronato por via intravenosa e cinco porcos (Grupo 2) serviram como controle. Após 6 semanas, foram realizadas extrações de dentes na maxila e na mandíbula (nos dois grupos) e a administração de bisfosfonatos continuou por

mais 10 semanas (somente no grupo 1). Os parâmetros clínicos e hematológicos foram monitorados durante todo o experimento. Em seguida, os ossos da mandíbula e maxila foram submetidos à avaliação macroscópica, radiológica (TC) e análise histológica. Todos os animais do grupo controle tiveram as feridas dos locais da extração cicatrizadas dentro de duas semanas. Enquanto isso, todos os animais que receberam bisfosfonato exibiram exposição óssea e cicatrização prejudicadas e uma macroscopia semelhante à osteonecrose avançada. As análises radiológica e histológica confirmaram a presença de BRONJ nos animais do grupo 1. Os autores concluíram que a administração de bisfosfonatos, em combinação com extrações dentais, induziu a BRONJ em modelo animal. Concluíram ainda que a capacidade de estudar BRONJ em mini-porcos, animais com uma estrutura óssea não muito diferente da presente nos seres humanos, pode melhorar o conhecimento sobre a etiopatogenia, a profilaxia e, potencialmente, descobrir novas terapias de BRONJ.

Perilli *et al.* (2010) realizaram um estudo cujo principal objetivo foi medir *in vivo* os efeitos da perda óssea induzida e do tratamento antireabsorção com ácido zoledrônico iniciado logo após a ooforectomia, bem como os efeitos do envelhecimento normal nos animais. Os animais (Ratas *Sprague-Dawley*) foram divididos em grupos: I (ovariectomizado, OVX); II (ovariectomizado e tratado com ácido zoledrônico- OVX+ZOL); III (operado, mas não ovariectomizado, SHAM). Nos exames de microtomografia nas tíbias de ratos (*in vivo*) e análise morfométrica o grupo OVX demonstrou drástica perda óssea. Por outro lado, na semana quatro, o grupo OVX+ZOL retornou aos valores basais. Isto confirma que o tratamento antireabsorção precoce facilita a reversão da perda do osso esponjoso e da deterioração da microarquitetura.

Abtahi *et al.* (2012) desenvolveram um modelo de osteonecrose com o objetivo de testar a hipótese que a morte do osteócito não é condição primariamente necessária no desenvolvimento da osteonecrose. Para tanto, utilizaram 40 ratos *Sprague-Dawley* machos que foram subdivididos em quatro grupos: 1-grupo controle, sem medicação; 2-alendronato 200µg/kg/dia por 14 dias; 3-alendronato 200µg/kg/dia por 14 dias + dexametasona 1mg/kg/dia por quatro dias; 4-alendronato 200µg/kg/dia por 14 dias + dexametasona 1mg/kg/dia por quatro dias. Todos os animais foram submetidos à extração unilateral de um molar. Os três primeiros grupos foram avaliados clinicamente e por meio de histologia e, para o último grupo, foi adicionalmente examinada a viabilidade dos osteócitos utilizando marcação imunohistoquímica. Todos animais que receberam o alendronato associado à dexametasona desenvolveram grandes lesões semelhantes à BRONJ na região da exodontia, por outro lado, esta associação não provocou a morte do osteócito no osso intacto, ou seja, onde não havia intervenção. Os autores concluíram que, possivelmente, a BRONJ surge somente após a exposição do osso e que os bisfosfonatos dificultam a reabsorção do osso que se tornou alterado devido à infecção.

O modelo animal desenvolvido por Aghaloo *et al.* (2011) incluiu a indução de uma doença periodontal avançada por meio da colocação de uma ligadura em 19 animais que recebiam injeções intraperitoniais de ácido zoledrônico três vezes por semana e em outros 19 ratos que recebiam somente placebo. A microtomografia computadorizada revelou a presença de osteonecrose nas regiões de periodontite induzida por ligadura nos animais tratados com bisfosfonato. Os principais achados foram os sequestros ósseos e a extensiva formação óssea alveolar periosteal. A análise histológica foi concordante com as imagens radiográficas e apresentava osso necrótico com perda difusa de osteócitos, lacunas vazias, osso necrosado envolto por epitélio escamoso e inflamação e exposição à

cavidade oral. Os resultados deste estudo sugerem que a associação de um potente bisfosfonato à doença periodontal é suficiente para o desenvolvimento de BRONJ no rato.

Com o objetivo de melhor elucidar a patogênese da osteonecrose, Kobayashi *et al.* (2010) examinaram os efeitos do ácido zoledrônico na cicatrização da ferida pós extração utilizando um modelo de exodontia em ratos. A análise histomorfométrica revelou que a quantidade de osso novo e os números de vasos sanguíneos no alvéolo foram significativamente menores no grupo tratado com Ácido Zoledrônico em comparação com os ratos controle. Em cultura celular, esta medicação inibiu significativamente a angiogênese induzida pelo fator de crescimento endotelial vascular *in vivo* e a proliferação de células endoteliais, de forma dose-dependente. Por outro lado, o Etidronato, um bisfosfonato não-nitrogenado, não demonstrou efeito sobre a osteogênese e a angiogênese. O Ácido Zoledrônico também foi capaz de suprimir a migração de células epiteliais bucais que é um passo crucial para a cicatrização do alvéolo pós exodontia. Além disso, o Ácido Zoledrônico promoveu a aderência de *Streptococcus mutans* à hidroxiapatita e a proliferação de bactérias orais que foram obtidas a partir de indivíduos saudáveis, o que sugere que o Ácido Zoledrônico pode aumentar a infecção bacteriana. Em conclusão, o estudo sugere que o ácido zoledrônico avaliado promove o atraso na cicatrização do alvéolo após a extração do dente, inibe a osteogênese e a angiogênese e altera o comportamento de bactérias orais.

López-Jornet *et al.* (2010) também descreveram um modelo de BRONJ em ratos tratado com BF e examinou as mudanças ocorridas após a extração do dente. Um total de 200 animais foram incluídos em um estudo prospectivo, randomizado, envolvendo os seguintes grupos: Grupo I (controle, 20 ratos sem tratamento medicamentoso), grupo II (60 animais tratados com Dexametasona 1 mg / kg / dia por 7, 14 e 21 dias, em sub-

grupos de 20 animais cada), grupo III (60 animais tratados com Pamidronato diariamente a uma dose de 3 mg / kg) e grupo IV (60 animais tratados com Pamidronato e Dexametasona). Em todos os grupos, a extração dos molares foi realizada 8, 15 e 22 dias após o início da medicação. Todos os ratos foram eutanasiados 14 e 28 dias após a extração. Um total de 18 casos de BRONJ foram registrados no grupo em que foi administrado o Pamidronato e a Dexametasona. A BRONJ afetou a maxila em dez casos e a mandíbula em oito casos e foi circunscrita à zona de extração em todos os casos. A BRONJ não foi observada em nenhum dos outros grupos. Os autores concluíram que a administração de pamidronato e dexametasona em ratos submetidos à extração de molar aumenta o risco de BRONJ.

A osteonecrose associada à administração de bisfosfonatos orais foi investigada em modelo animal utilizando cadelas beagle por Allen & Burr (2008). Trinta e seis cadelas receberam Alendronato oral ou placebo por três anos. O Alendronato foi administrado nas doses aproximadas utilizadas no tratamento da osteoporose (0,20 mg/kg/dia) e da Doença de Paget (1,0 mg/kg/dia). A região do segundo molar inferior foi incluída em bloco, imersa em fucsina básica e conduzida para histologia para avaliar a necrose da matriz e a remodelação do osso medular. A necrose da matriz foi definida como uma área maior $500\mu\text{m}^2$ que não se corava com a fucsina básica na observação por microscopia de campo claro e confocal. Nenhum animal desenvolveu lesões com exposição óssea. A necrose da matriz foi observada em 25% dos animais que receberam 0,2 mg/kg/dia de Alendronato, em 33% daqueles que receberam 1,0 mg/kg/dia e em nenhum animal do grupo controle ($p < 0,05$ grupo alendronato X grupo controle). Estas regiões necróticas ocorreram predominantemente no osso alveolar. A taxa de remodelação óssea intracortical foi significativamente menor na região do osso alveolar mandibular dos animais que receberam alendronato quando comparados aos que receberam placebo (-

75%, $p < 0,05$). Os autores concluíram que o uso diário de alendronato no período de três anos reduz a remodelação óssea significativamente e aumenta a incidência de necrose da matriz na mandíbula de cachorros.

O mesmo grupo de estudo (Allen *et al.*, 2010) realizou estudo que tinha como objetivo avaliar os efeitos do ácido zoledrônico, em doses utilizadas para o tratamento de câncer, na remodelação óssea em diferentes locais do esqueleto. Fizeram parte deste experimento cadelas beagle que foram tratados com infusões intravenosas mensais de veículo (VEH, soro fisiológico) ou ácido zoledrônico (ZOL, 0,067 mg/kg) e um grupo adicional de animais que receberam doses diárias de alendronato (ALN, 0,2 mg/kg/dia). Estas doses de ZOL e ALN foram baseadas nas doses utilizadas para o câncer e osteoporose em humanos, respectivamente. Após 3 ou 6 meses de tratamento, os animais foram sacrificados e a mandíbula, costela e a tíbia foram processados para análise por meio de histologia óssea dinâmica. Não houve evidência de lesões orais ou necrose da matriz óssea em nenhum dos animais estudados. Depois de 3 meses de administração das medicações observou-se que o grupo que recebeu ZOL tinha uma taxa de remodelação do osso medular significativamente menor (- 95%) em comparação com o grupo controle. Após seis meses de medicação, os animais que receberam o ácido zoledrônico tiveram uma supressão quase completa da remodelação (- 99%) em comparação ao grupo controle. A supressão da remodelação em animais do grupo tratado com ZOL era significativamente maior do que nos animais tratados com ALN. Quando comparados o nível de supressão da remodelação nos diferentes sítios esqueléticos em animais tratados com ZOL, observou-se que a maior supressão ocorreu nos locais com altas taxas de remodelação, assim como os menores níveis de supressão ocorreram nos sítios com menores taxas de remodelação.

3. Objetivos

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo animal de osteonecrose associada ao uso de bisfosfonatos em ratos e investigar as alterações ósseas em maxila e mandíbula por meio de microtomografia computadorizada.

3.2. Objetivos Específicos

- Verificar clinicamente a presença da osteonecrose.
- Verificar a presença de alterações imagenológicas características da osteonecrose.
- Avaliar a relação entre as alterações imagenológicas e o tempo de uso da medicação.
- Avaliar as alterações imagenológicas em função da realização de extração.

4. Metodologia

4. Metodologia

4.1. Animais e medicação

O 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) foi aprovado em 19 de janeiro de 2012, sob o protocolo UnBDOC número 41597/2010. Este trabalho foi fomentado pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) sob o Projeto de nº 324/2010 e Processo de nº 193.000.413/2010.

O desenho inicial do estudo contemplava o uso de 135 ratos Wistar divididos em nove grupos, com 15 animais em cada grupo: Grupo 1: Controle (C); Grupo 2: Grupo Pamidronato 1 (PA1), Pamidronato 3 mg/kg três vezes por semana durante seis semanas; Grupo 3: Grupo Pamidronato 2 (PA2), Pamidronato 1,5 mg/kg três vezes por semana durante seis semanas; Grupo 4: Grupo Pamidronato 3 (PA3), 3 mg/kg três vezes por semana durante oito semanas; Grupo 5: Grupo Pamidronato 4 (PA4), Pamidronato 1,5 mg/kg três vezes por semana durante oito semanas; Grupo 6: Grupo Zolendronato 1 (ZA1), Zolendronato 0,1 mg/kg três vezes por semana durante seis semanas; Grupo 7: Grupo Zolendronato 2 (ZA2), 0,05mg/kg três vezes por semana durante seis semanas; Grupo 8: Grupo Zolendronato 3 (ZA3), 0,1mg/kg três vezes por semana durante oito semanas e Grupo 9: Grupo Zolendronato 4 (ZA4), Zolendronato 0,05mg/kg três vezes por semana durante oito semanas (Figura 2). Neste desenho inicial o objetivo do estudo seria verificar as alterações causadas na maxila e na mandíbula de ratos pelo uso de diferentes BFs, em diferentes doses e em diferentes regimes de administração, comparar as alterações ósseas com os aspectos histológicos e avaliar o efeito da extração dentária na

etiopatogenia da osteonecrose induzida por bisfosfonatos. Contudo, dificuldades como redução no valor do fomento que impediu a aquisição de toda a medicação, atraso na liberação da verba da pesquisa que levou à prorrogação em um ano o início do experimento e a necessidade de substituição de uma peça no microtomógrafo que deixou o equipamento sem a possibilidade de uso por seis meses, conduziram a uma necessidade de ajustes no tamanho da amostra de forma que se fizesse possível a continuidade do trabalho.

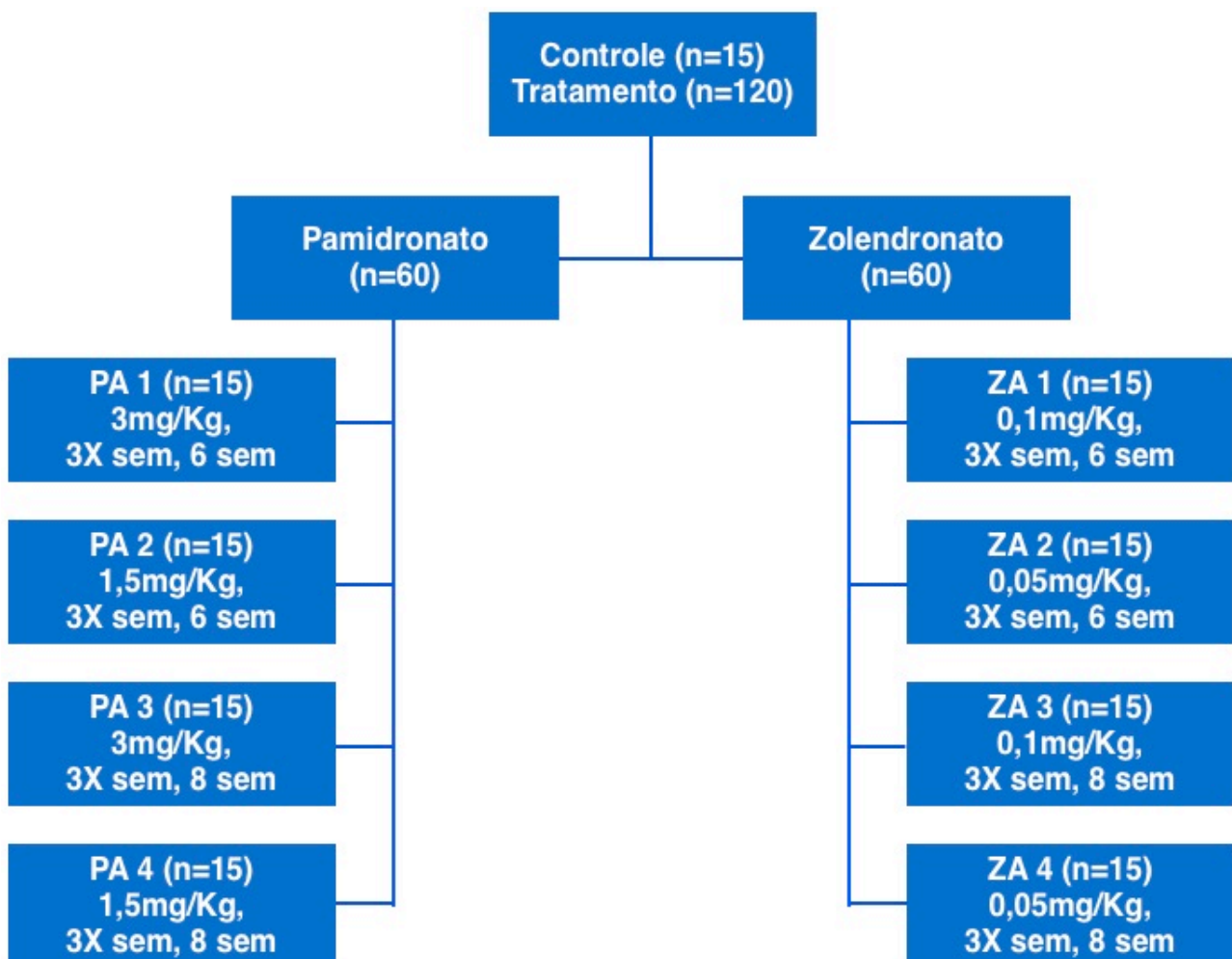


Figura 2 – Diagrama do delineamento experimental inicial

O desenho experimental final (Figura 3) incluiu 36 ratas fêmeas da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*), com peso aproximado de 300 g (90 dias). Os animais foram alocados no Biotério de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília e climatizados por duas semanas antes do início do experimento. Os animais foram selecionados e aleatoriamente distribuídos em caixas de polipropileno com tampa zincada, 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 *ad libitum*.

O Ácido Zoledrônico administrado foi adquirido do Laboratório Eurofarma (São Paulo, Brasil) em solução injetável de 4mg/5ml.

4.2. Desenho experimental e procedimento cirúrgico

Após o período de adaptação no biotério, os animais foram divididos em quatro grupos: Grupo 1: Grupo Zolendronato 1 (ZA1), receberam Zolendronato 66 µg/kg, três vezes por semana, durante seis semanas; Grupo 2: Grupo Zolendronato 2 (ZA2), receberam Zolendronato 66 µg/kg, três vezes por semana, durante oito semanas; Grupo 3: Grupo Controle 1 (C1), receberam soro fisiológico, três vezes por semana, durante seis semanas e Grupo 4: Grupo Controle 2 (C2), receberam soro fisiológico, três vezes por semana, durante oito semanas. As medicações foram administradas por via intraperitoneal e injetadas pelo mesmo operador (Figura 4). A dose de 66 µg/kg de zolendronato corresponde à dose de 4mg/60kg usualmente administrada de forma mensal em pacientes oncológicos para o controle das metástases ósseas.

Todos animais foram submetidos ao primeiro escaneamento microtomográfico no dia zero do experimento, ou seja, imediatamente prévio à administração da medicação. A

tomada da microtomografia obedeceu a um rígido protocolo com intuito de fornecer uma boa analgesia, anestesia e sedação aos animais durante o seu escaneamento. Os ratos foram anestesiados com Cloridrato de Cetamina 10% e sedados com Xilazina 2% (doses de 90 e 15 mg/Kg respectivamente) aplicados por via intramuscular com agulha hipodérmica 0,30 x 13mm (BD Precision Glide ®). Oito animais foram excluídos do estudo ou por que morreram no período entre a extração e a eutanásia ou por perda de dados na reconstrução.

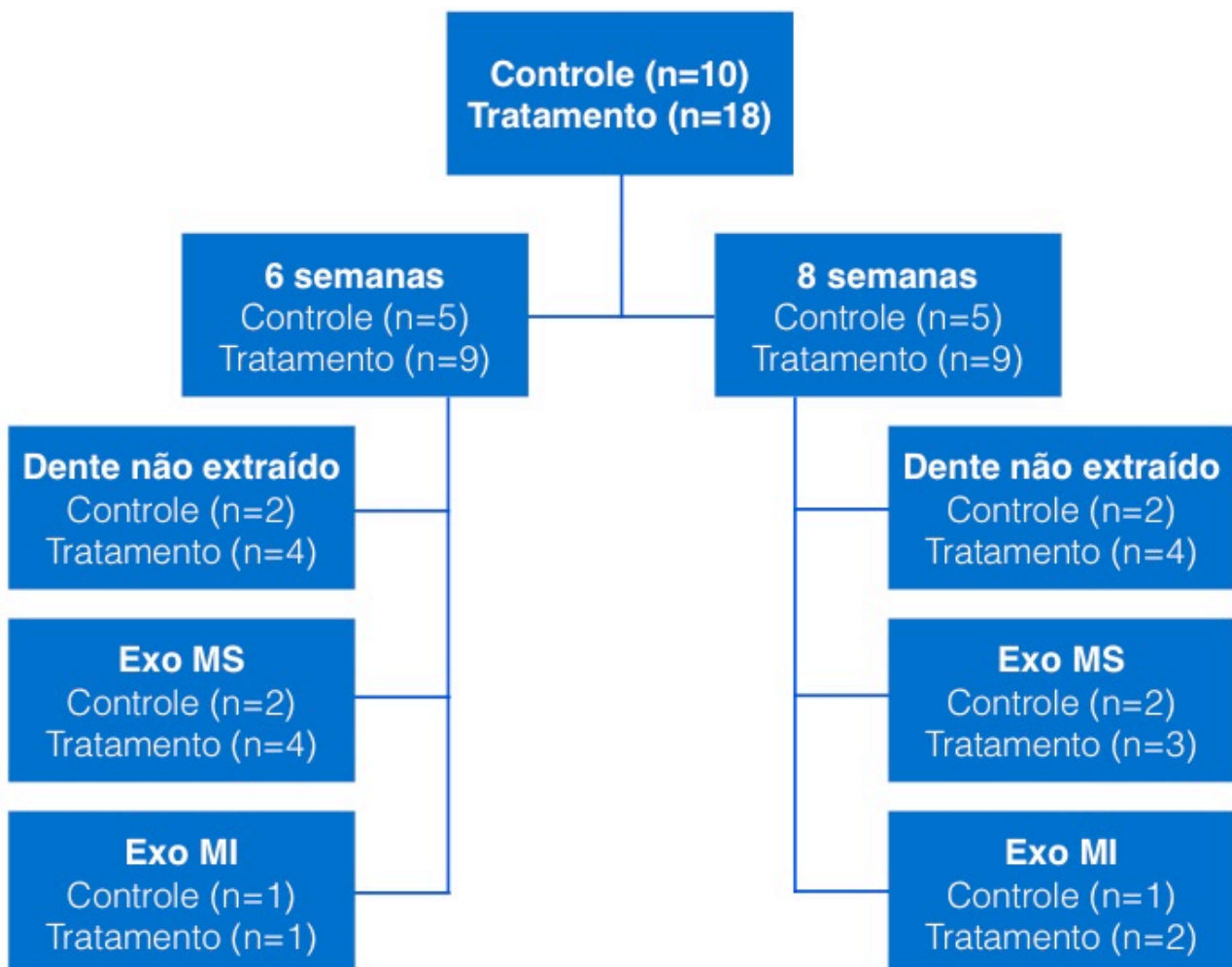


Figura 3. Diagrama do delineamento experimental final

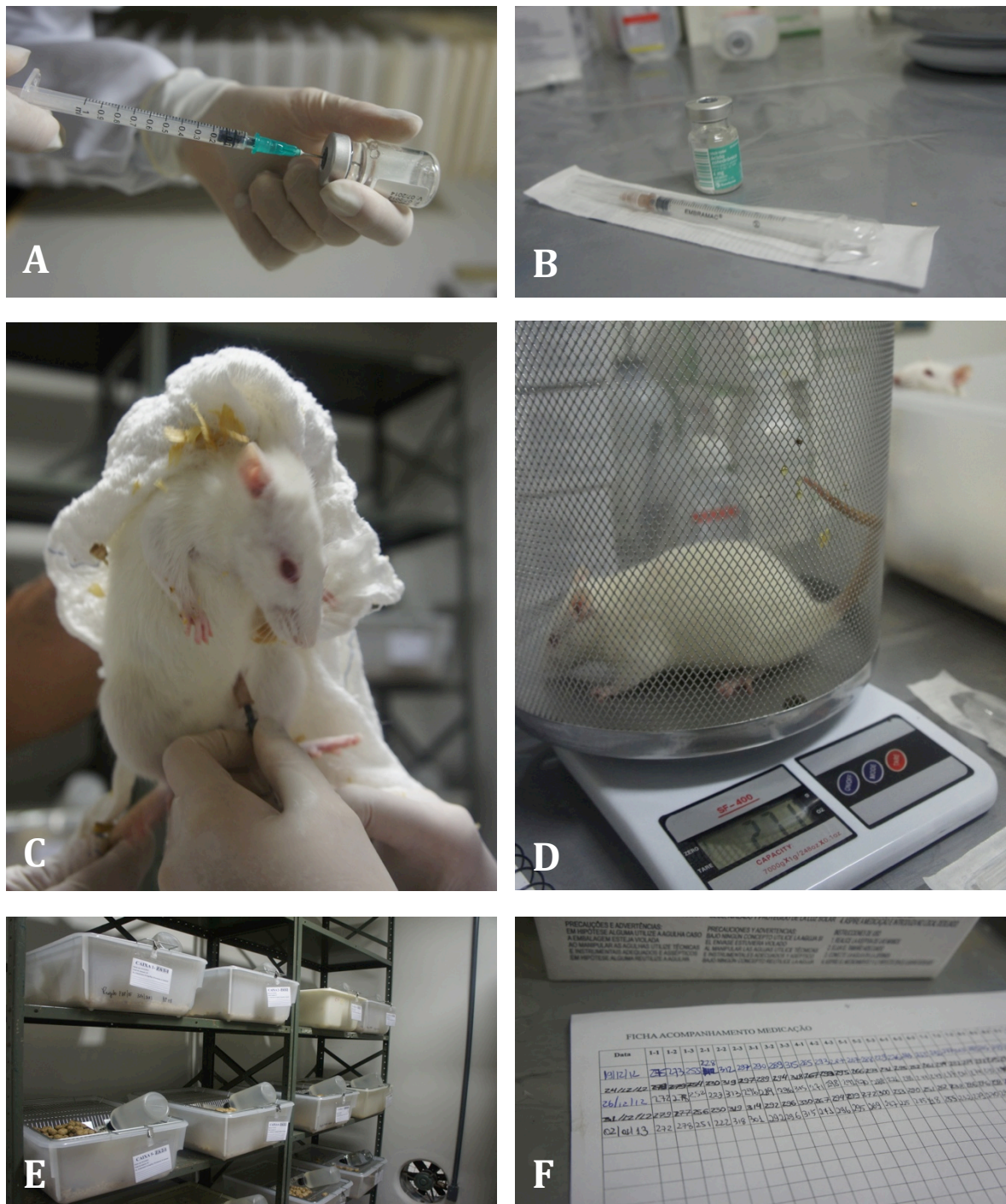


Figura 4. Administração da medicação dos animais. A e B- Preparo da medicação. C-Injeção da medicação pela via intraperitoneal. D-Pesagem dos animais. E e F- Disposição das gaiolas no biotério e ficha de acompanhamento da medicação.

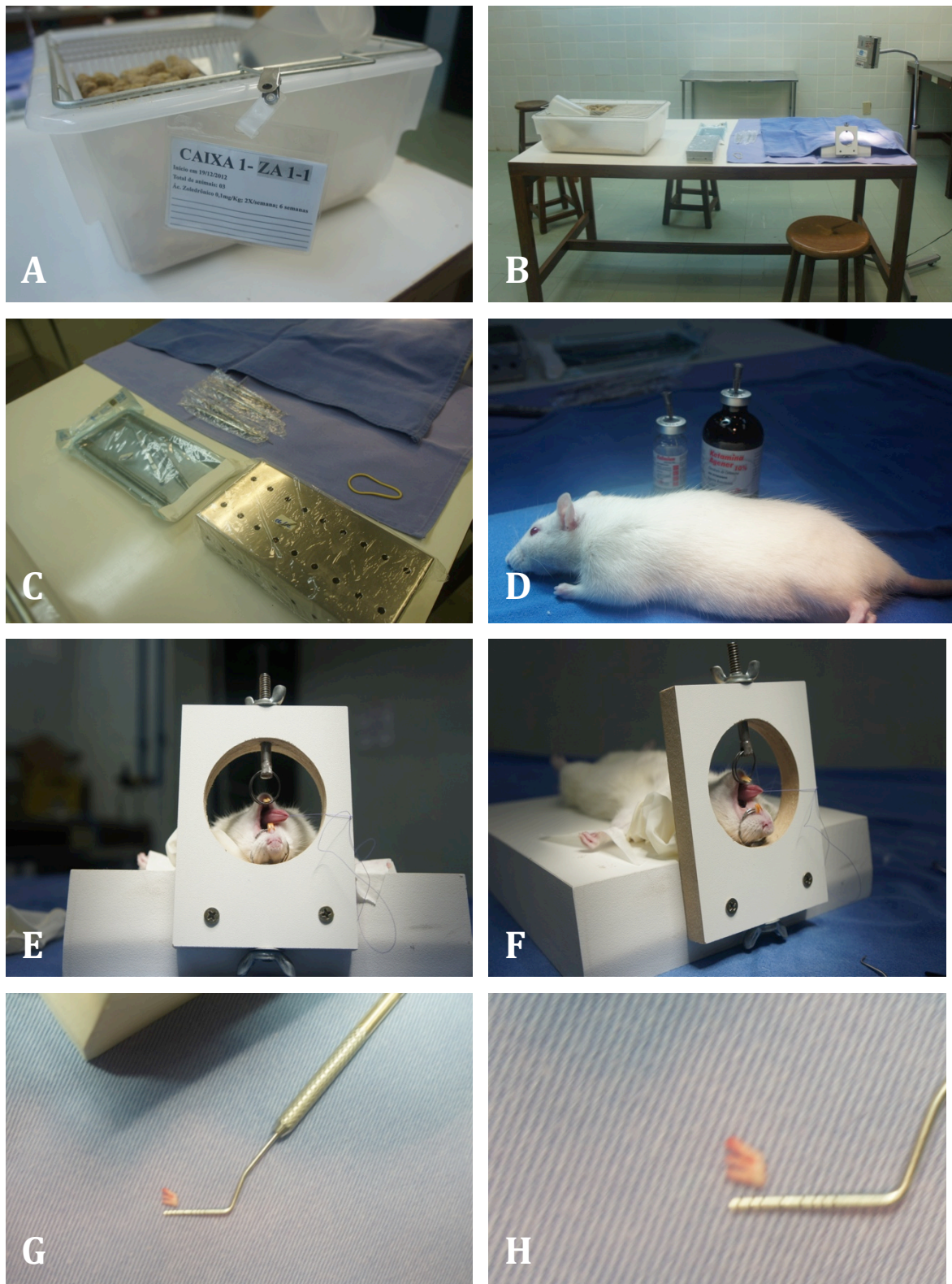


Figura 5. Procedimento cirúrgico de exodontia. A-Caixa onde os animais eram acomodados. B e C-Sala cirúrgica equipada com materiais esterilizados para a execução do procedimento cirúrgico. D-Animal anestesiado. E e F-Dispositivo idealizado para realização das exodontias que permitia a manutenção da abertura bucal durante a cirurgia. G e H-Dente extraído em menor aumento e em maior aumento.

A partir do primeiro dia do experimento (dia 1) os animais receberam a medicação ou o soro fisiológico, três vezes por semana, por seis ou oito semanas conforme o grupo ao qual pertenciam. Os ratos foram observados e pesados três vezes por semana no decorrer da pesquisa. Após três semanas do início da medicação os animais foram selecionados aleatoriamente e submetidos ou a extrações dos primeiros molares inferiores do lado esquerdo ou dos primeiros molares superiores do lado esquerdo ou não foram submetidos a nenhum procedimento cirúrgico conforme o diagrama da Figura 3. As extrações foram realizadas sob anestesia, seguindo o mesmo protocolo anestésico descrito para a realização das microtomografias. Os dentes foram extraídos por um único operador e suturados com fio reabsorvível 5-0. Após a cirurgia, foi administrado Cloridrato de tramadol, solução injetável de 50mg, 30mg/kg a cada 12 horas nas primeiras 48 horas (Figura 5). Dez semanas após a realização das extrações, ou seja, no 90º dia do experimento, os animais foram eutanasiados com gás carbônico. As cabeças dos animais foram guilhotinadas, fixadas em formalina 10%, avaliadas clinicamente, fotografadas e então uma nova tomada microtomográfica foi realizada conforme *timeline* na Figura 6.

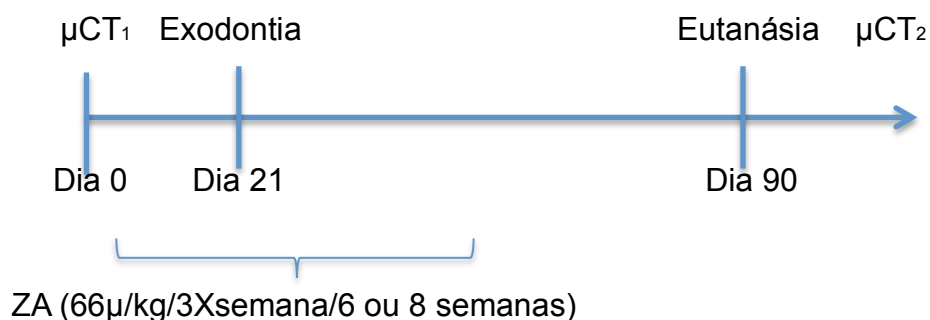


Figura 6. *Timeline* do delineamento da pesquisa

4.3. Critérios utilizados na avaliação clínica

A avaliação clínica foi realizada por uma única pessoa, após a eutanásia dos animais, por meio de observação direta, em sala clara e apropriada para inspeção. O animal foi posicionado, os lábios e mucosa jugal foram afastados e então uma minuciosa inspeção foi conduzida quanto à presença ou ausência de osteonecrose clínica, caracterizada por exposição óssea na maxila ou na mandíbula. Os critérios para a avaliação clínica foram a presença ou ausência de eritema, exposição óssea, secreção purulenta e fístula.

4.4. Escaneamento por microtomografia computadorizada

Para a realização da microtomografia computadorizada foi utilizado o aparelho de microtomografia *in vivo* Skyscan 1076 (Skyscan, Aartselaar, Bélgica), presente no Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

O aparelho dispunha de câmera de vídeo e aparelhos para monitoramento do animal durante o escaneamento. A microtomografia foi realizada com tamanho de voxel isotrópico de 18 x 18 x 18 μ m e um tempo de escaneamento aproximado de 37 minutos por escaneamento. As reconstruções bidimensionais foram realizadas com o *software* NRecon (V 1.6.9, versão 64 bit com aceleração GPU, Skyscan, Kontich, Bélgica) e as tridimensionais com os *softwares* CTvox (V 1.5.0, versão 64 bit, Skyscan, Kontich, Bélgica) e CTvol (V 2.2, versão 64 bit, Skyscan, Kontich, Bélgica) (Figura 7).

4.5. Análise das Imagens por microtomografia

As imagens foram analisadas nos *softwares* Dataviewer (V 1.5.0, versão 64 bit, Skyscan, Kontich, Bélgica) e CTAn (V 1.13, versão 64 bit, Skyscan, Kontich, Bélgica) por dois radiologistas experientes que desconheciam as 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.

As tomadas microtomográficas foram avaliadas quanto à presença ou ausência de sinais como lesão osteolítica sem rompimento de cortical óssea, lesão osteolítica com rompimento de cortical óssea, reação periosteal e sequestro ósseo. As imagens não foram avaliadas quanto ao tamanho e extensão lesão, assim como não foi analisada a densidade mineral óssea das amostras.

4.6. Análise estatística

Os dados referentes à presença de osteonecrose clínica e classificação microtomográfica das alterações ósseas foram avaliados em suas frequências absolutas e relativas em função do uso da medicação (bisfosfonato), tempo de uso da medicação e tipo de dente extraído ao longo da experimentação. Não foram realizadas estatísticas inferenciais em função do baixo n amostral. Os dados foram expressos em tabelas e gráficos de colunas.

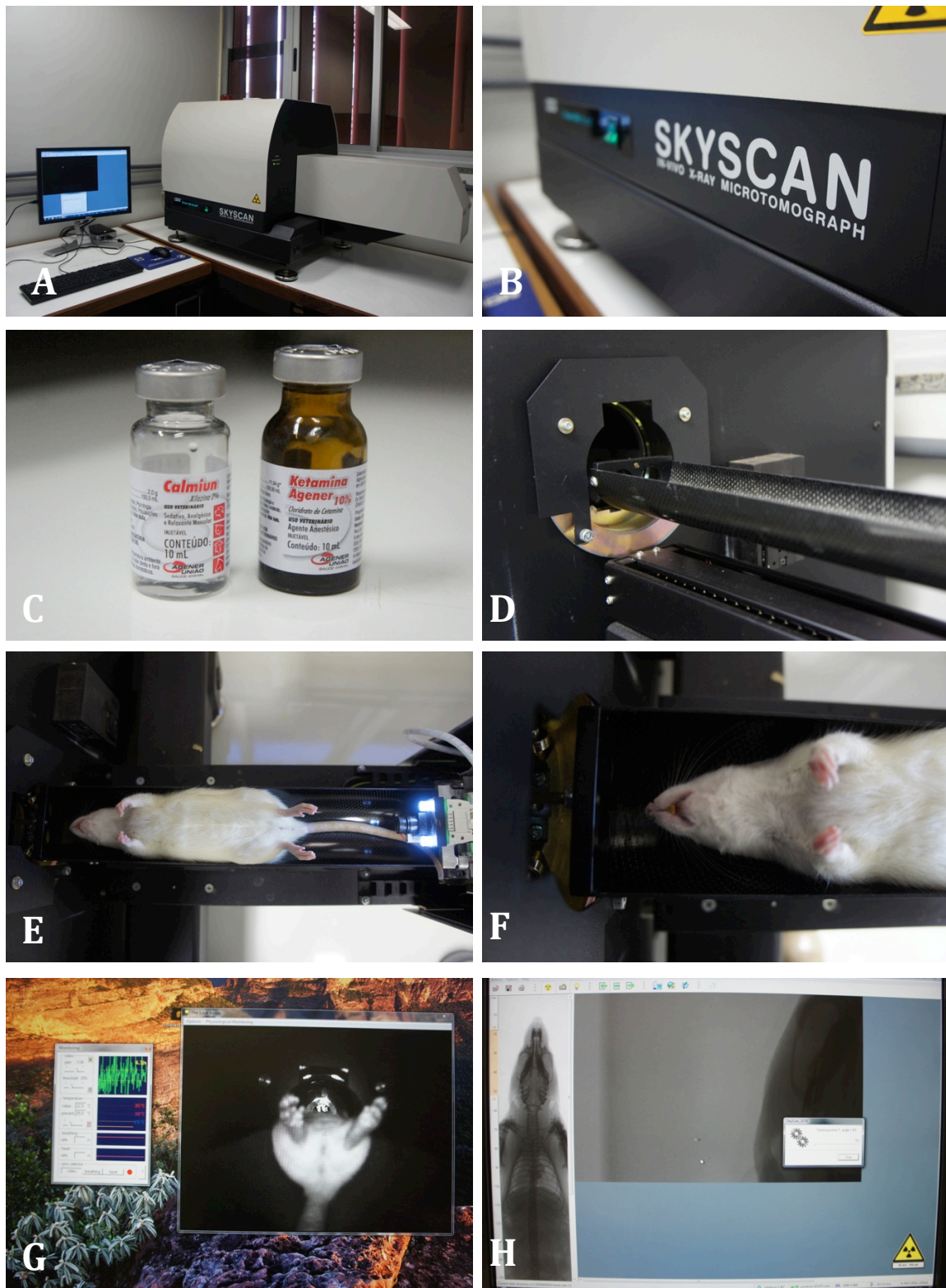


Figura 7. Aquisição das imagens por meio do microTC. A e B-Aspecto externo do microTC *in vivo* Skyscan 1076 (Skyscan, Aartselaar, Bélgica). C-Cloridrato de Cetamina e Xilazina, medicamentos utilizados na anestesia e analgesia dos animais. D-Aspecto da canaleta onde os objetos ou animais a serem escaneados são dispostos. E- Aspecto da disposição do animal dentro da canaleta. Observar luzes acesas à direita que correspondem ao local da câmera de monitoramento dos sinais vitais do animal. F- Vista aproximada da disposição do animal dentro da canaleta. G-Aspecto do monitoramento fisiológico do animal onde é possível ter visualização direta do animal, assim como acompanhar sua temperatura corpórea e batimentos cardíacos. H-Aspecto do *software* durante a aquisição das imagens.

5. Resultados

5. Resultados

O presente estudo tinha como objetivo a obtenção de um modelo animal de osteonecrose induzida pelo uso de bisfosfonatos nos animais que foram submetidos a extrações dentárias de molares superiores e inferiores.

Ao exame clínico macroscópico, foi possível verificar que o grupo controle não apresentou osteonecrose com provável cicatrização nos animais que tiveram extrações dentárias. Considerando o grupo de animais tratados com bisfosfonatos por seis e oito semanas a osteonecrose foi evidenciada clinicamente mais nos animais tratados por 8 semanas. (Figura 8).

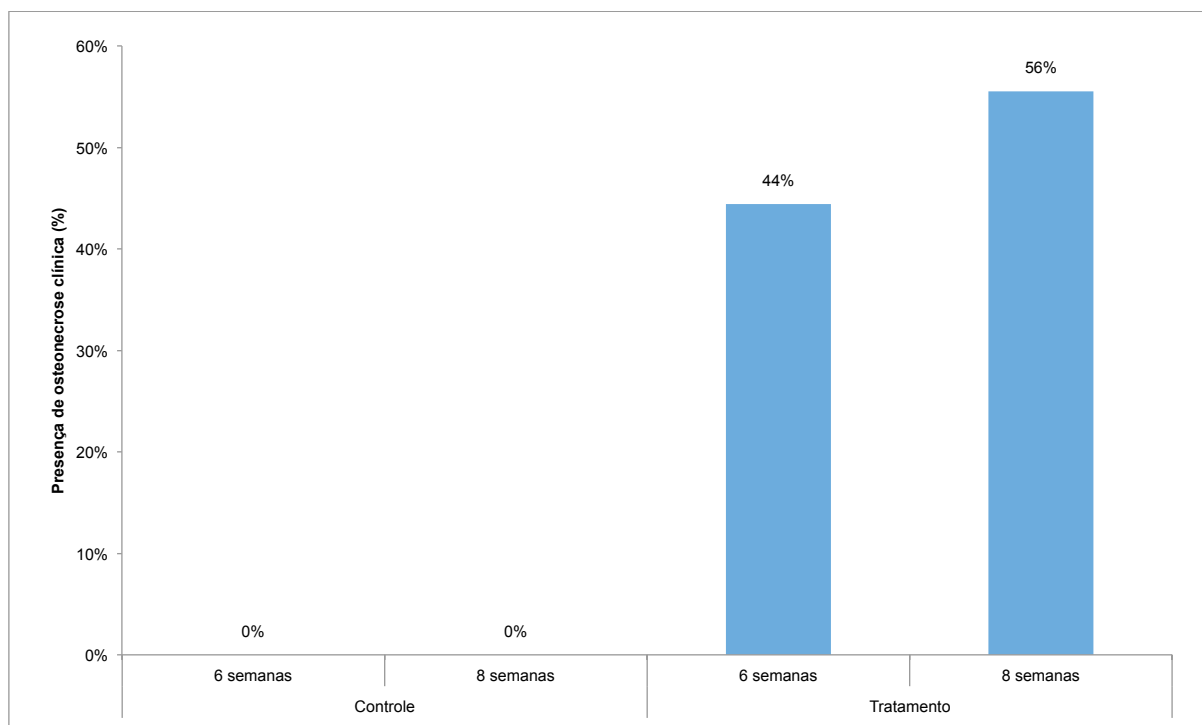


Figura 8. Frequência relativa percentual da presença de osteonecrose clínica em ratos controle e submetidos ao tratamento com bisfosfonato por 6 e 8 semanas.

Quando considerados animais tratados com bisfosfonatos que tiveram molares superiores e inferiores extraídos, a osteonecrose clínica foi observada na maioria dos animais que tiveram dentes extraídos na maxila e na mandíbula (Figura 9).

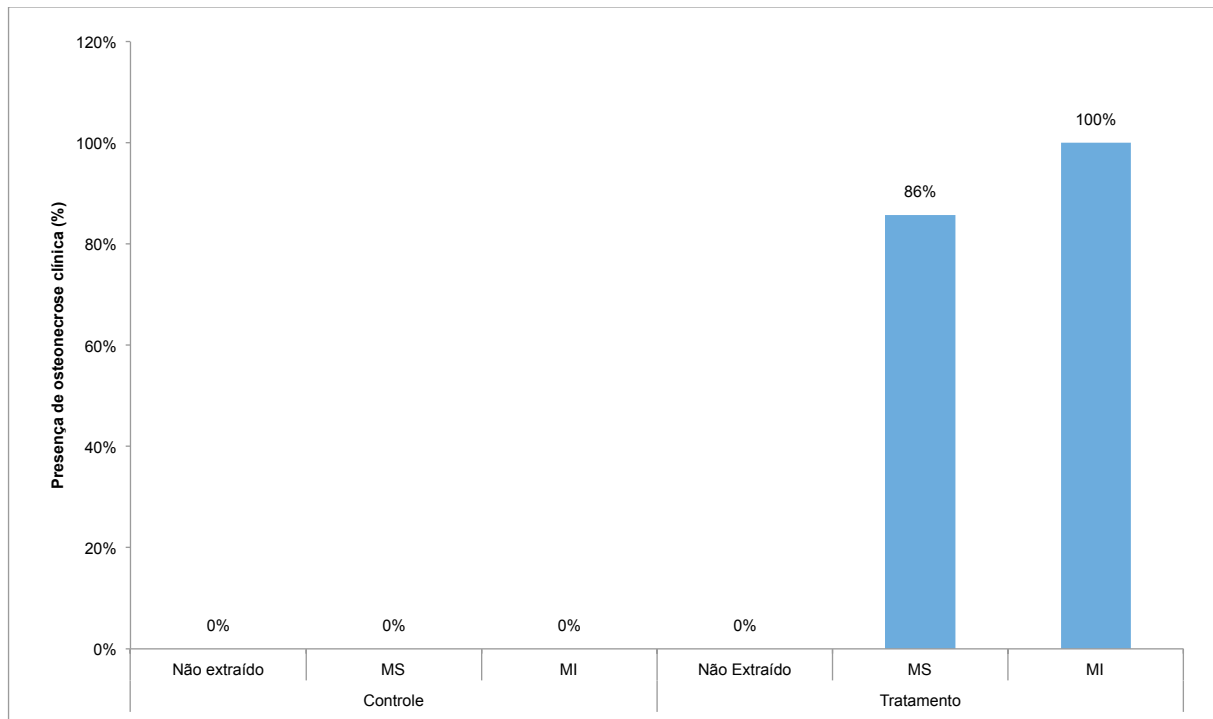


Figura 9. Frequência relativa percentual da presença de osteonecrose clínica em ratos controle e submetidos ao tratamento com bisfosfonato, que apresentaram extração dos molares superiores (MS), molares inferiores (MI) ou não extração.

A Figura 10 demonstra as alterações clínicas evidenciadas nos animais do estudo, como exposição óssea nos locais de extração, com feridas abertas e fístulas extra orais. A figura apresenta também o processo de eutanásia e decapitação do animal para a realização da microtomografia final (Figura 10. H).

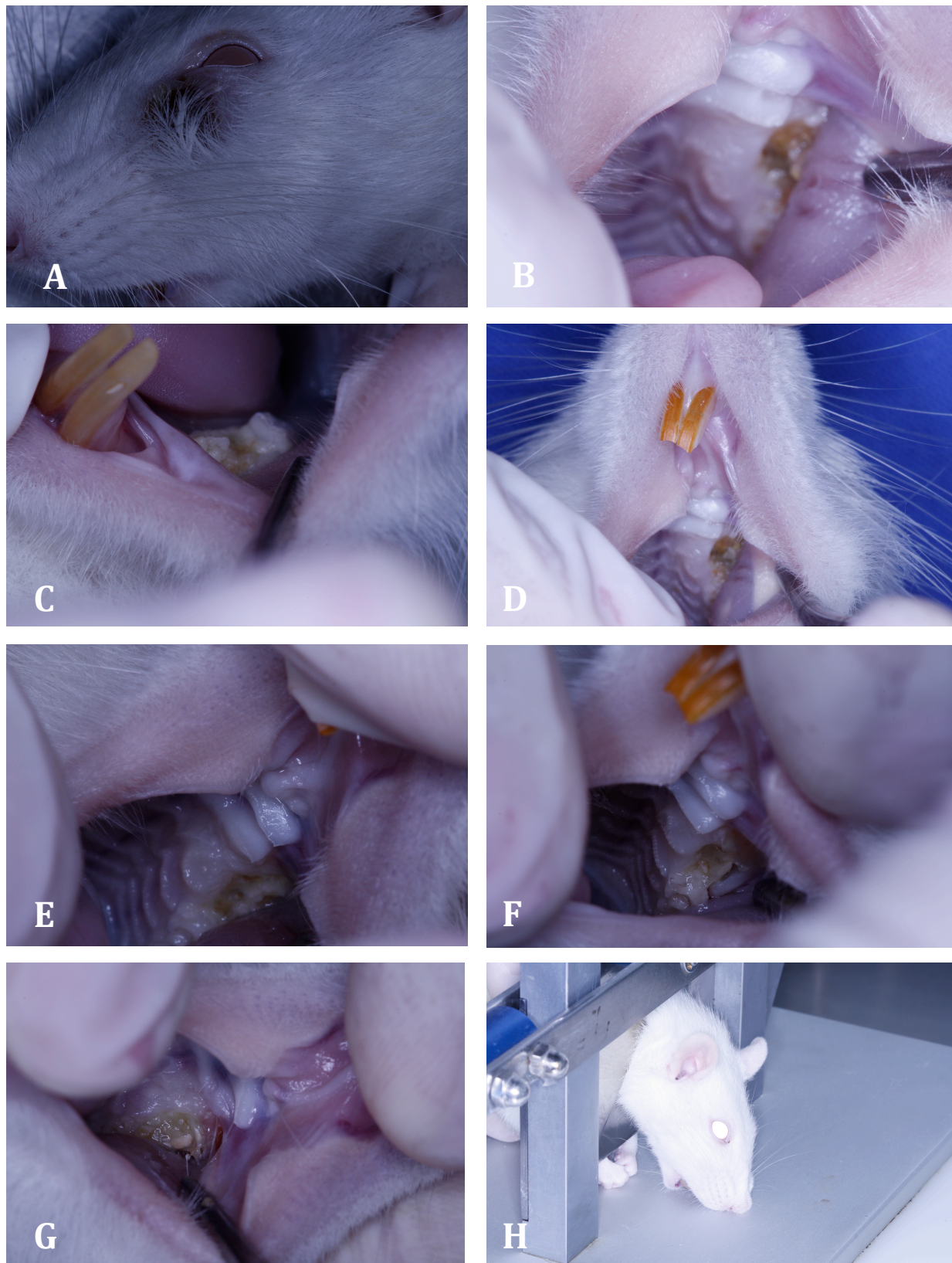


Figura 10. Aspectos clínicos das lesões de osteonecrose em animais que receberam BF. A - Fístula extraoral em animal que foi submetido à extração de molar superior. B, C, D, E, F e G - Aspecto das áreas intrabucais com evidência clínica de exposição óssea, algumas áreas circundantes com tecido inflamado (G). Todas estas áreas correspondem a locais onde foram realizadas extrações prévias. H - Guilhotina utilizada para decapitação do animal após o procedimento de eutanásia.

Quanto à classificação microtomográfica da lesão, foi possível verificar que os ratos do grupo controle não manifestaram nenhuma lesão em nenhum dos dois períodos. A tabela 1 e figura 11 apresentam as frequências de aparecimento das lesões osteolíticas nos animais tratados com bisfosfonatos por 6 e 8 semanas.

Tabela 1. Frequências absolutas e relativas (%) das alterações ósseas evidenciadas no exame microtomográficos dos ratos controle e submetidos ao tratamento com bisfosfonato por 6 e 8 semanas.

Variáveis	Controle		Tratamento	
	6 semanas	8 semanas	6 semanas	8 semanas
Normal ou cicatrizado	5 100,00%	5 100,00%	6 66,67%	4 44,44%
Lesão osteolítica ou não cicatrização sem rompimento cortical	0 0,00%	0 0,00%	1 11,11%	3 33,33%
Lesão osteolítica com rompimento cortical	0 0,00%	0 0,00%	2 22,22%	2 22,22%
Reação peristeal	0 0,00%	0 0,00%	2 22,22%	3 33,33%

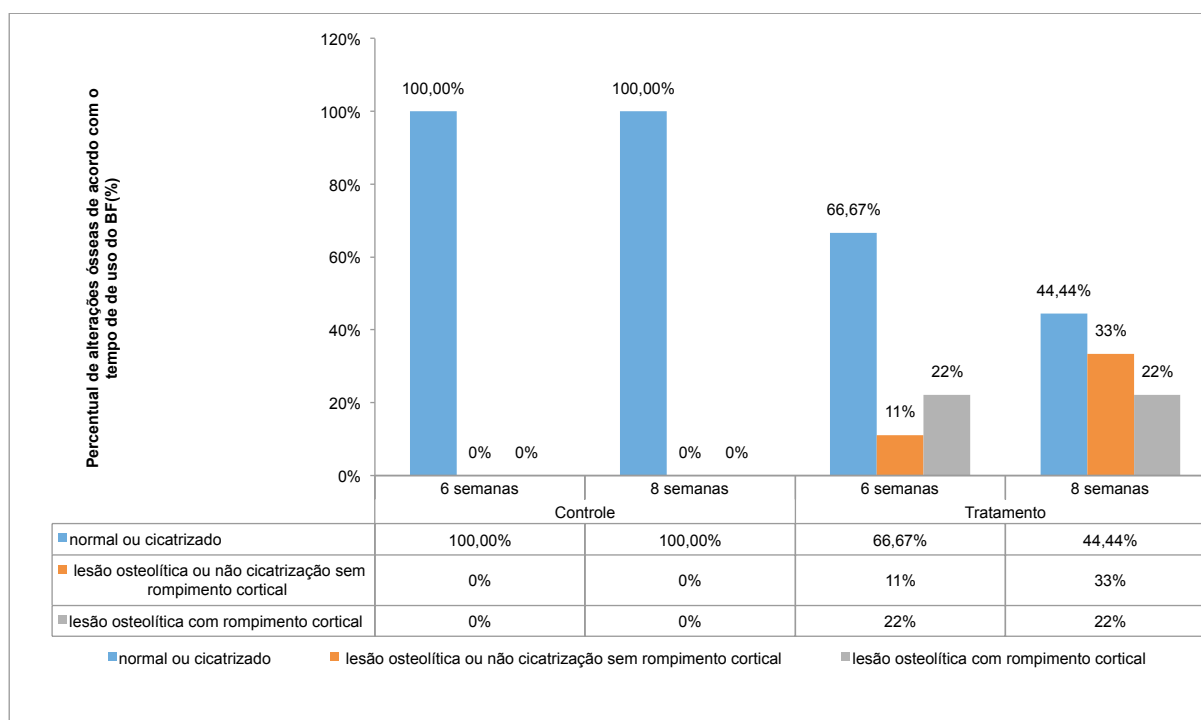


Figura 11. Frequência relativa percentual das classificações microtomográficas de lesão osteolítica em ratos controle e submetidos ao tratamento com bisfosfonato por 6 e 8 semanas.

Nenhum animal do grupo controle apresentou reação periosteal/bicorticalização. A Figura 12 apresenta a frequência do aparecimento desta reação periosteal/bicorticalização nos grupos de animais tratados com 6 e 8 semanas.

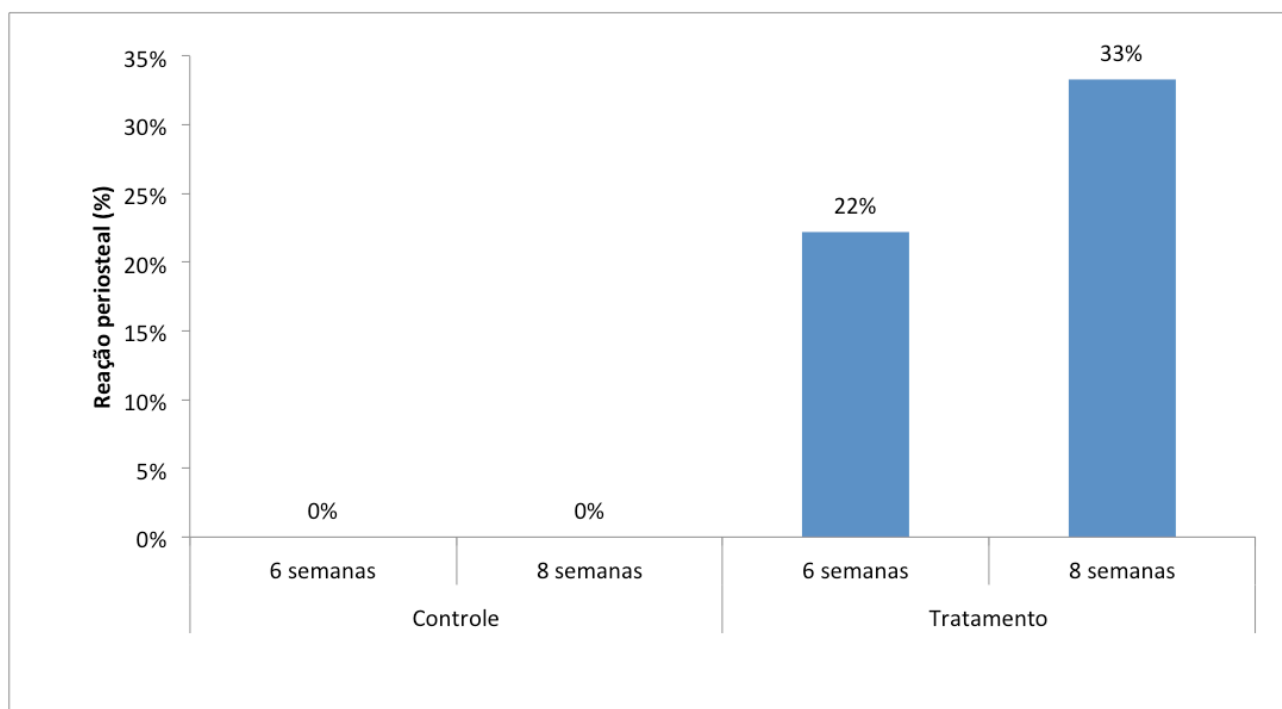


Figura 12. Frequência relativa percentual da reação periosteal em ratos controle e submetidos ao tratamento com bisfosfonato por 6 e 8 semanas.

Quando realizada a comparação da frequência dos achados microtomográficos em função dos dentes extraídos, os resultados demonstraram que apenas os animais que tiveram extrações e receberam a medicação por 6 e 8 semanas apresentaram algum tipo de alteração óssea. Em relação às lesões osteolíticas na microtomografia, a Tabela 2 e a Figura 13 apresentam as frequências relativas encontradas. Dos 7 ratos que extraíram os molares superiores, 4 (57%) apresentaram lesão osteolítica sem rompimento da cortical e 1 (14%) apresentou lesão osteolítica com rompimento da cortical; entre os 3 ratos que extraíram os molares inferiores, todos (100%) apresentaram lesão osteolítica com rompimento da cortical.

Tabela 2. Frequências absolutas e relativas (%) das lesões osteolíticas evidenciadas pelas microtomografias dos ratos controle e submetidos ao tratamento com bisfosfonato, que apresentaram extração dos molares superiores (MS), molares inferiores (MI) ou não extração.

Variáveis	Controle			Tratamento		
	Não extraído	MS	MI	Não Extraído	MS	MI
Normal ou cicatrizado	4 100,00%	4 100,00%	2 100,00%	8 100,00%	2 28,57%	0 0,00%
Lesão osteolítica ou não cicatrização sem rompimento cortical	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	4 57,14%	0 0,00%
Lesão osteolítica com rompimento cortical	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	1 14,29%	3 100,00%
Reação periosteal	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	2 28,57%	3 100,00%

MI = molares inferiores extraídos, MS = molares superiores extraídos

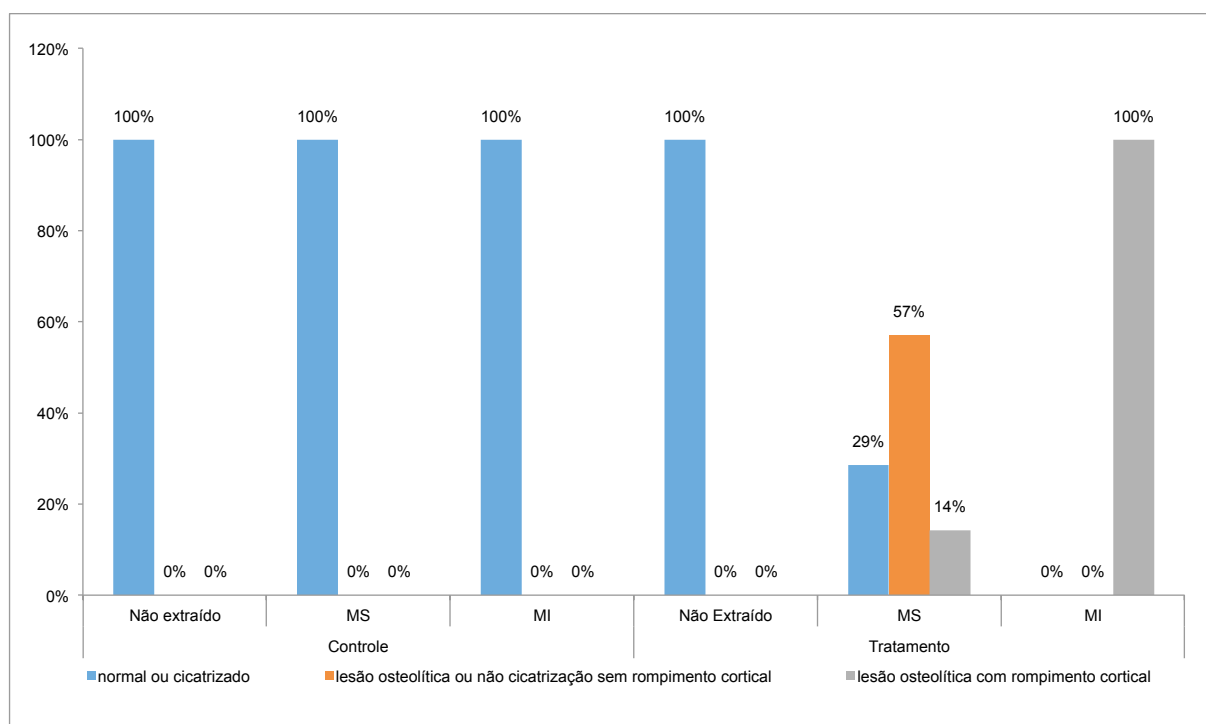


Figura 13. Frequência relativa percentual das classificações tomográficas de lesão osteolítica em ratos controle e submetidos ao tratamento com bisfosfonato, que apresentaram extração dos molares superiores (MS), molares inferiores (MI) ou não extração.

Ainda considerando os grupos de animais que tiveram extrações dentárias realizadas, a reação periosteal/ bicorticalização foi observada em 2 animais que tiveram molares superiores extraídos (29%) e em todos os ratos que tiveram molares inferiores extraídos (figura 14).

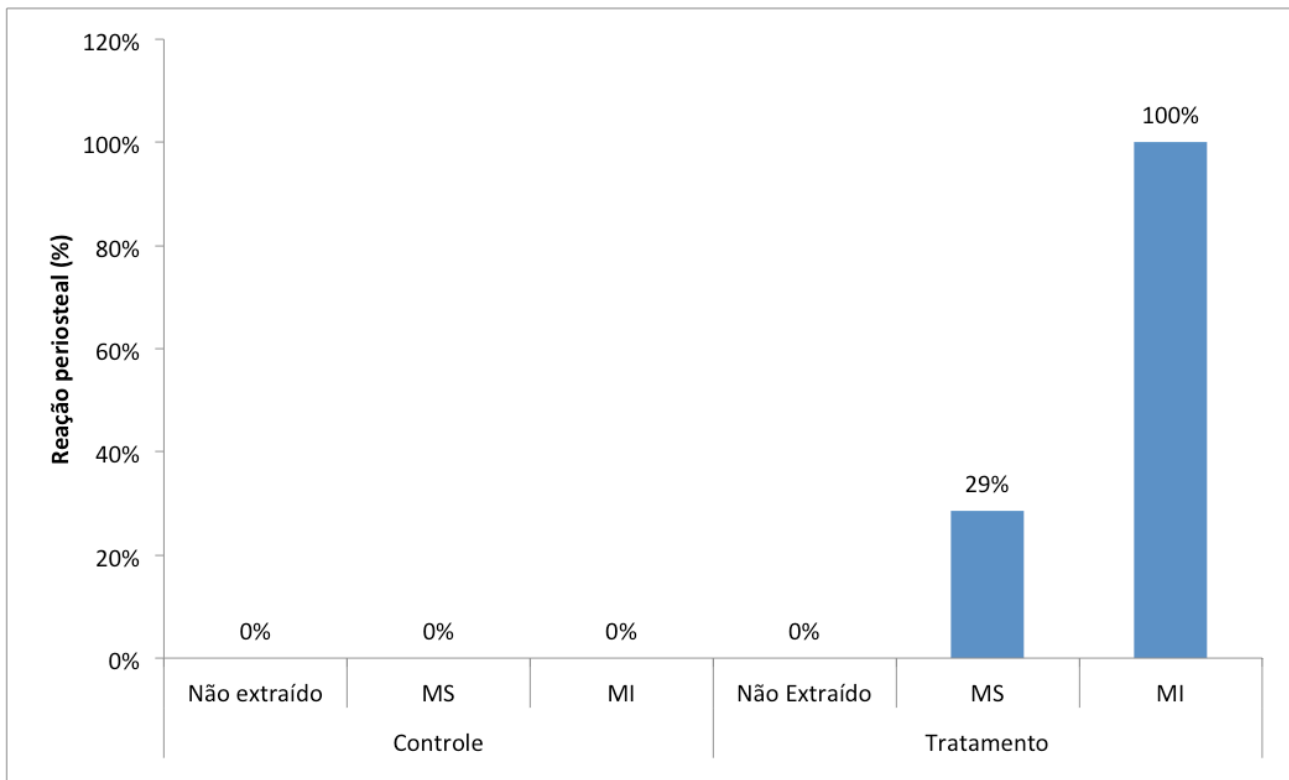
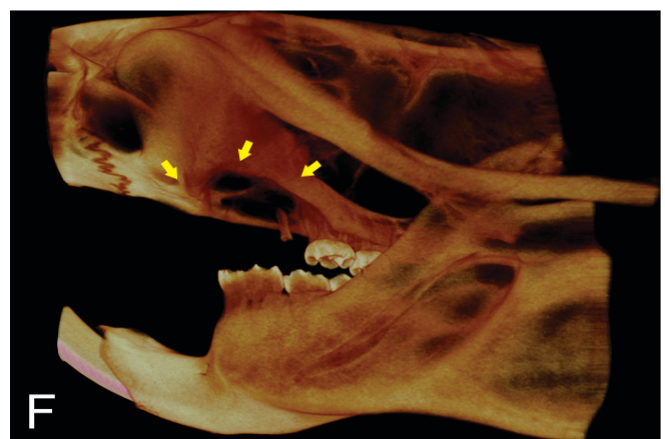
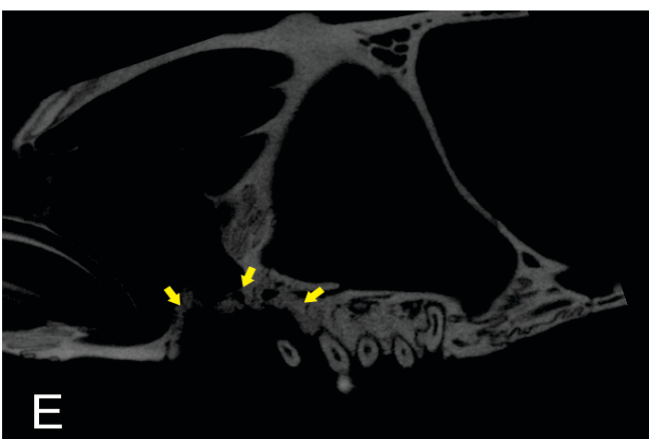
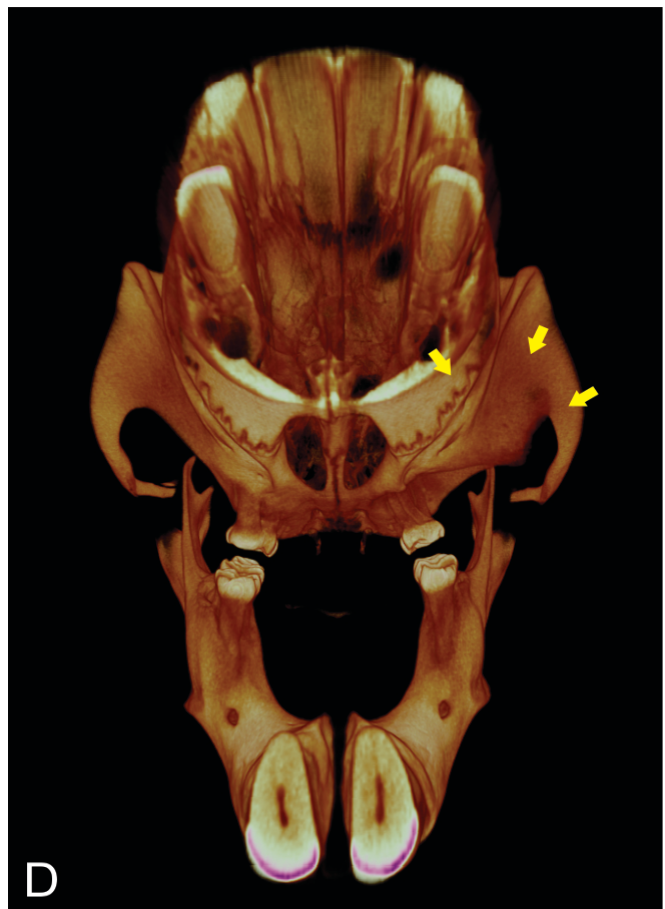
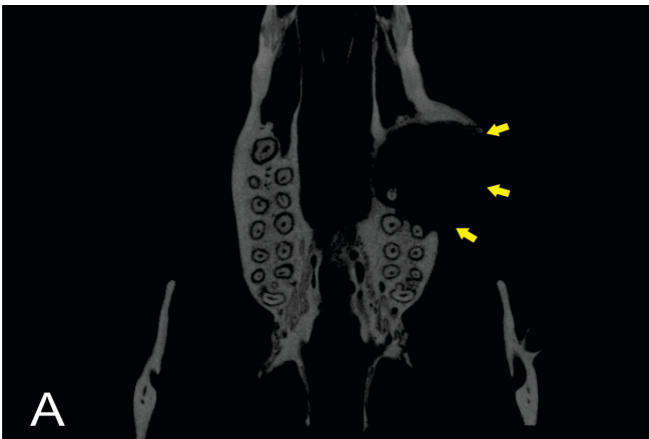
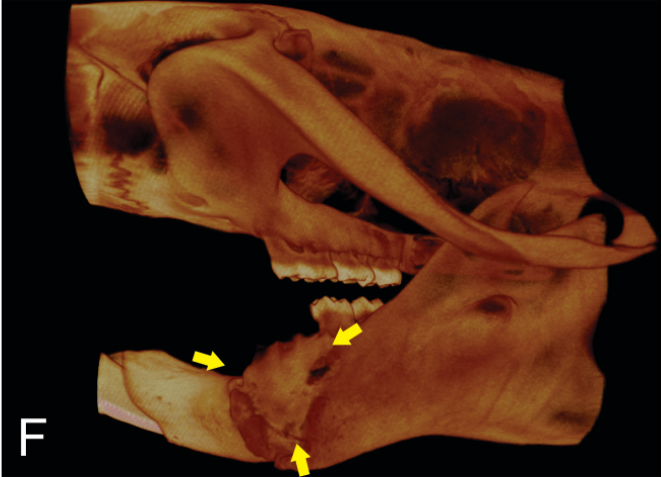
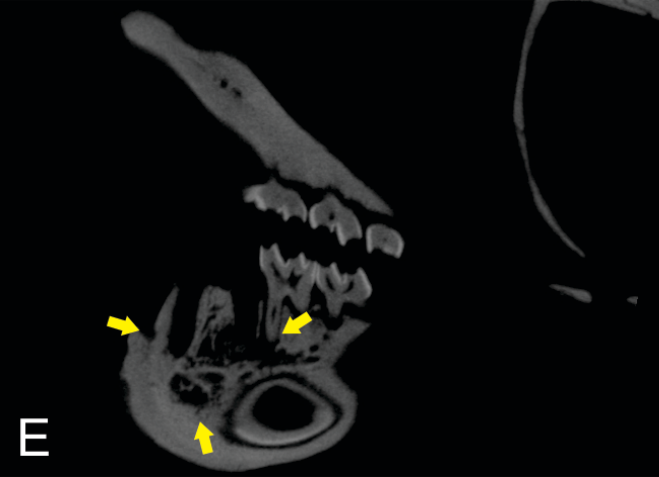
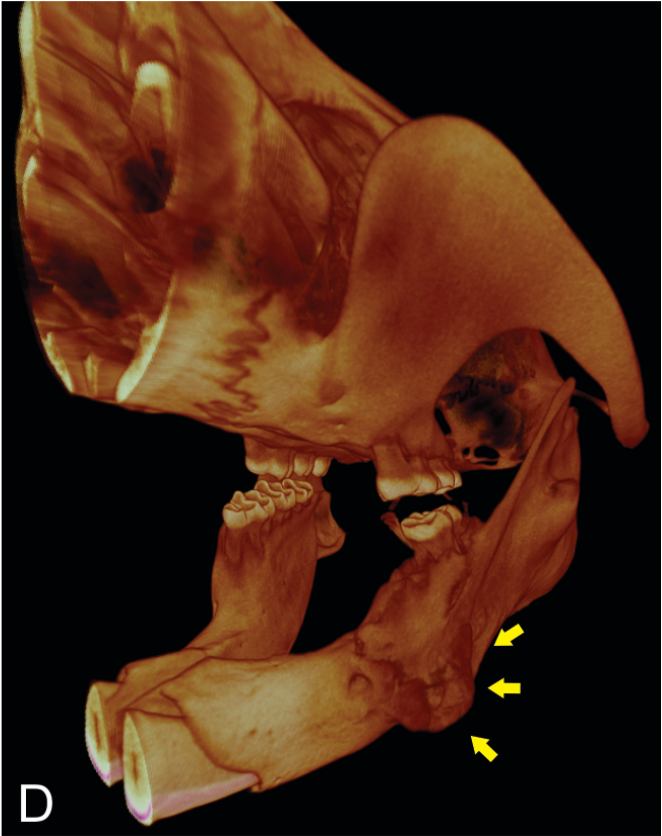
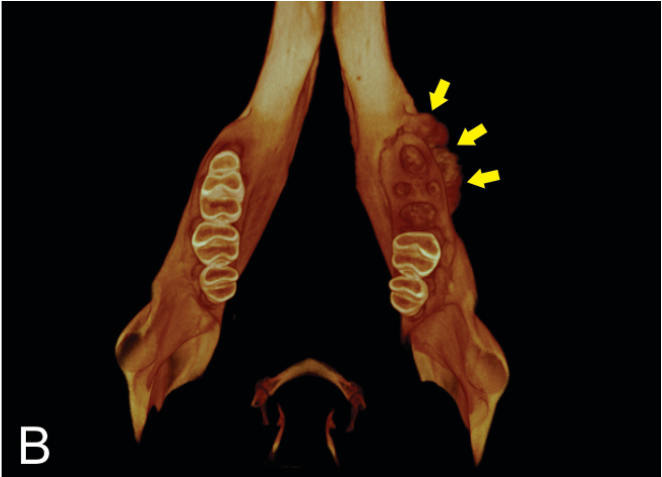
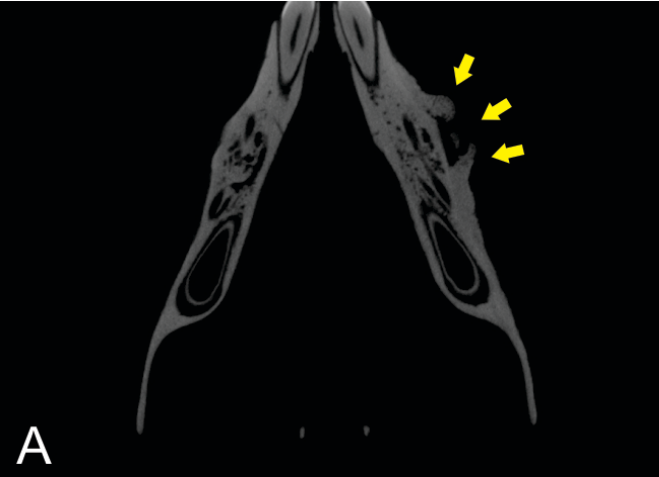


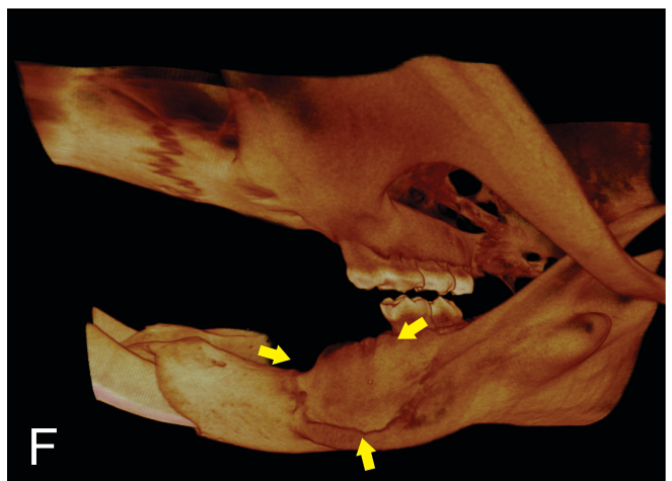
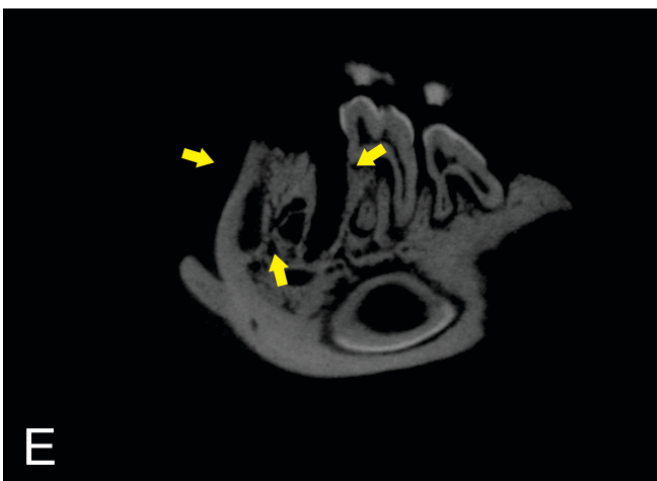
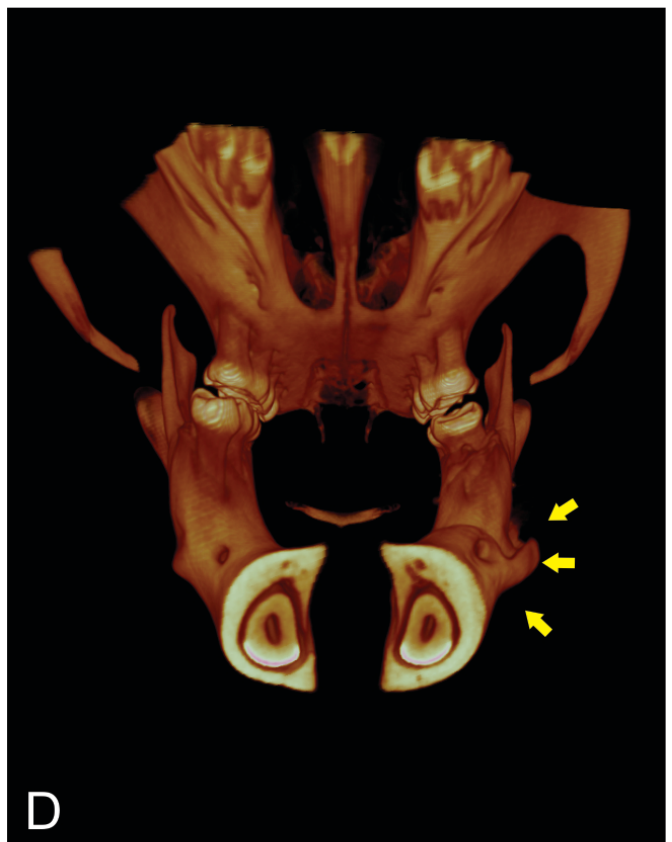
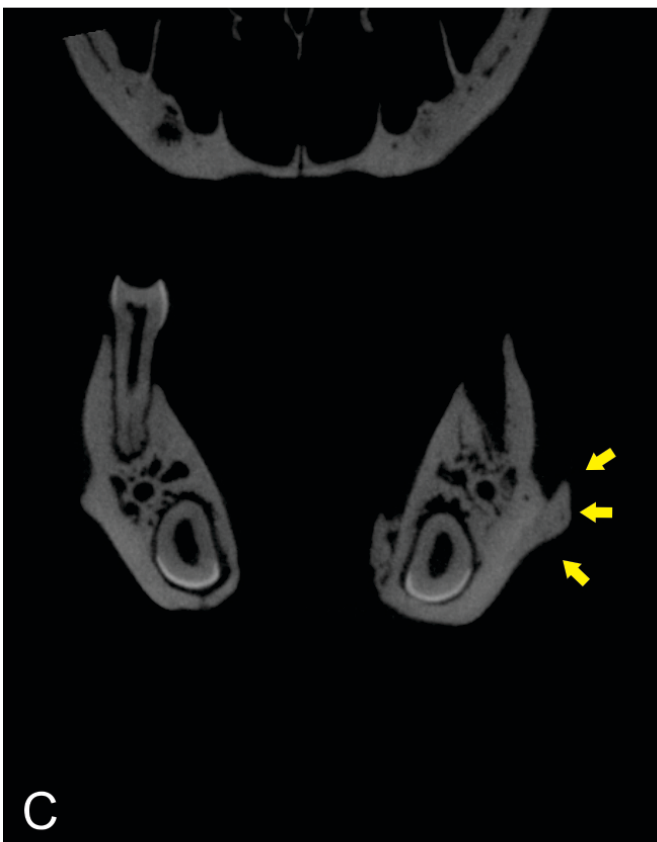
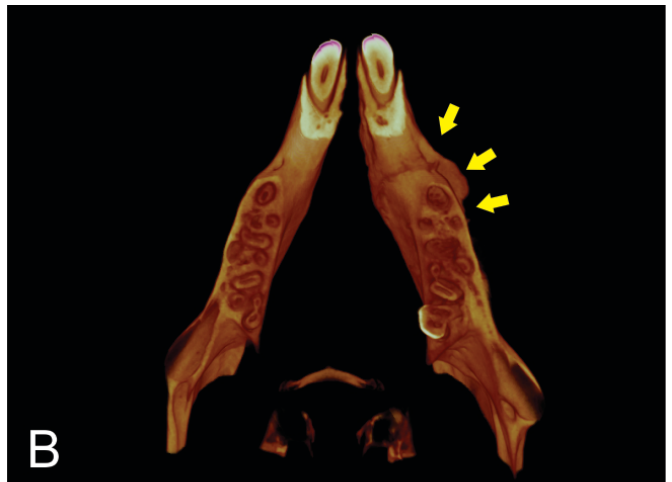
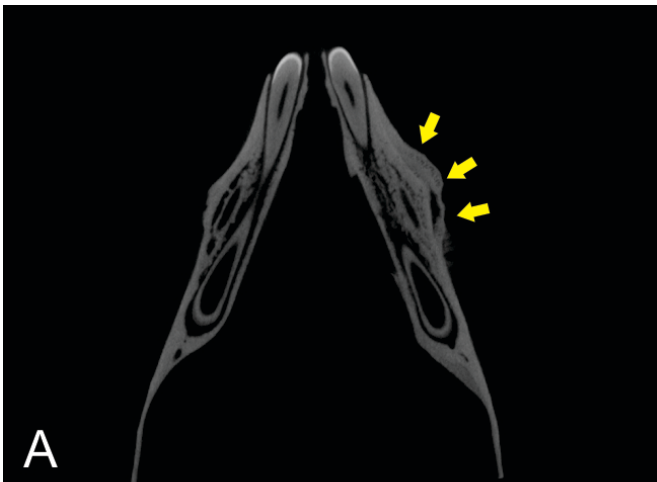
Figura 14. Frequência relativa percentual de reação periosteal em ratos controle e submetidos ao tratamento com bisfosfonato, que apresentaram extração dos molares superiores (MS), molares inferiores (MI) ou não extração.

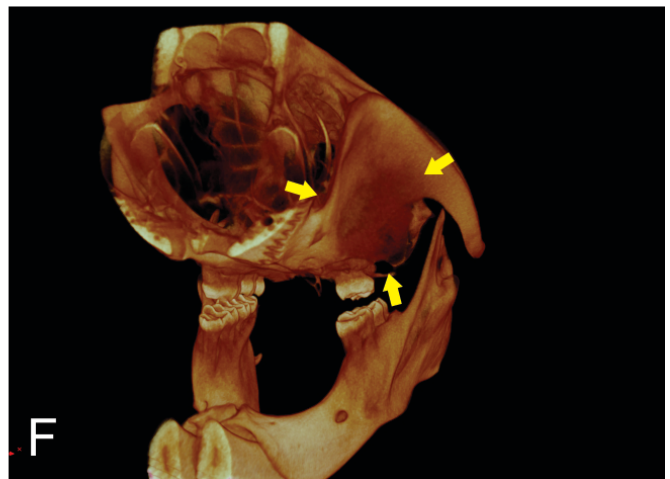
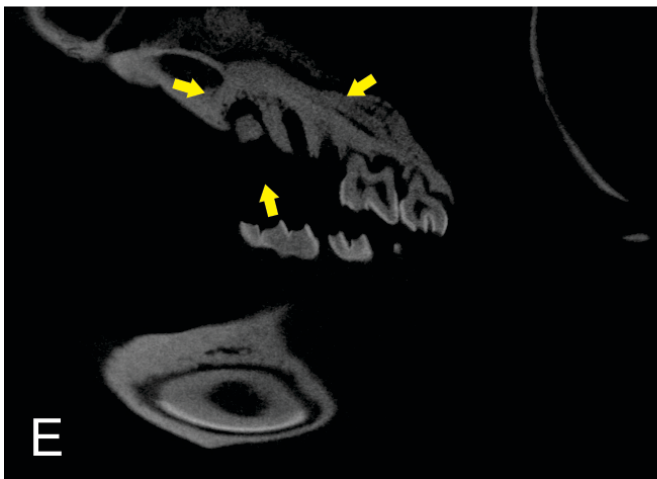
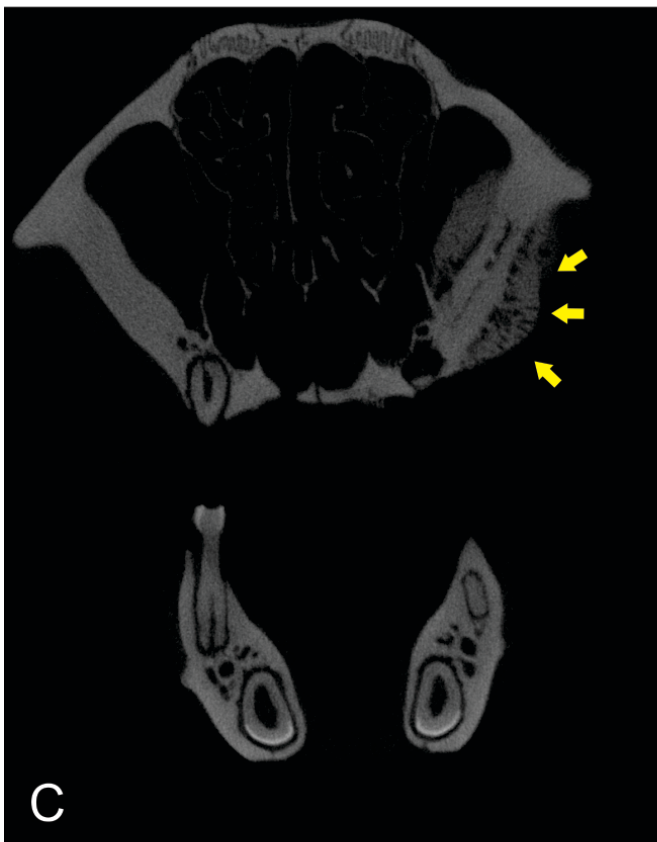
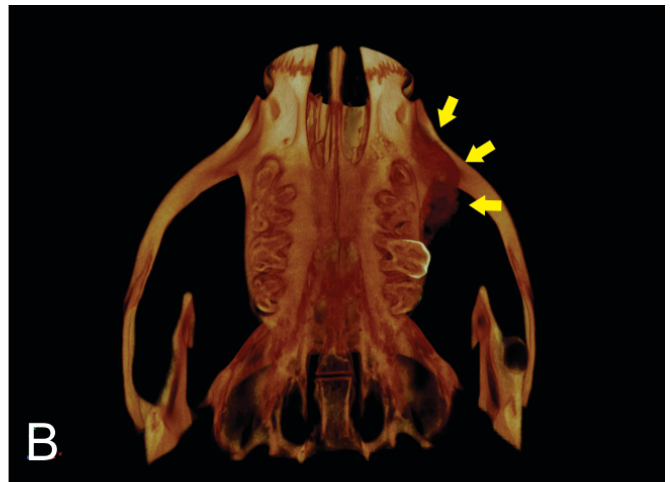
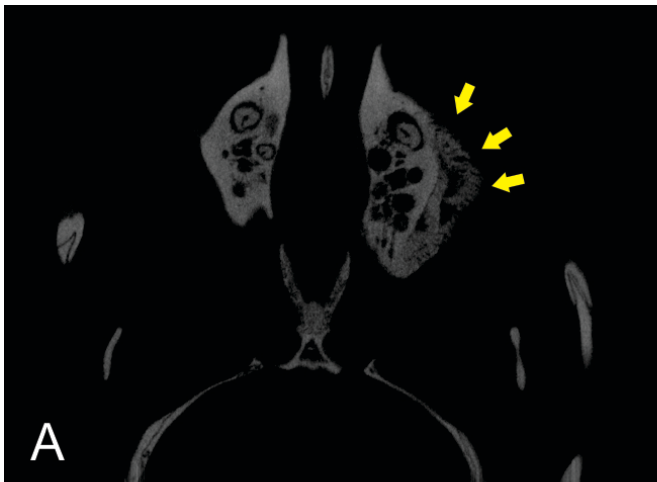
A formação do sequestro ósseo não foi verificada em nenhum animal, seja do grupo controle, seja do grupo tratado.

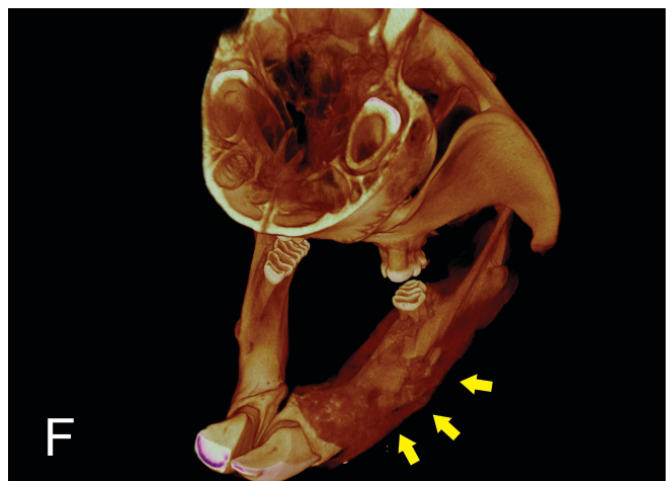
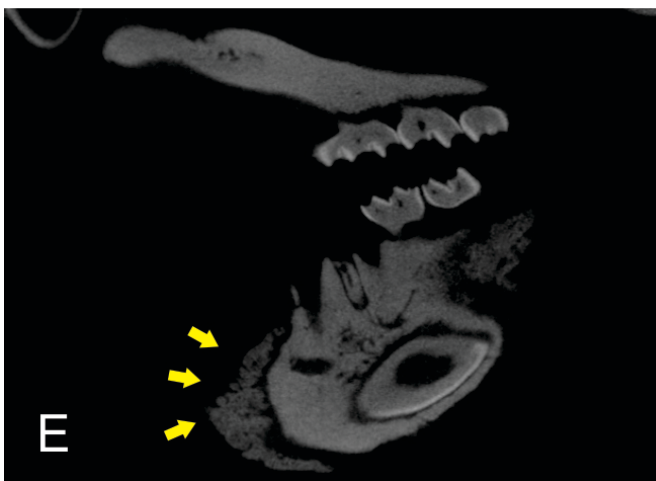
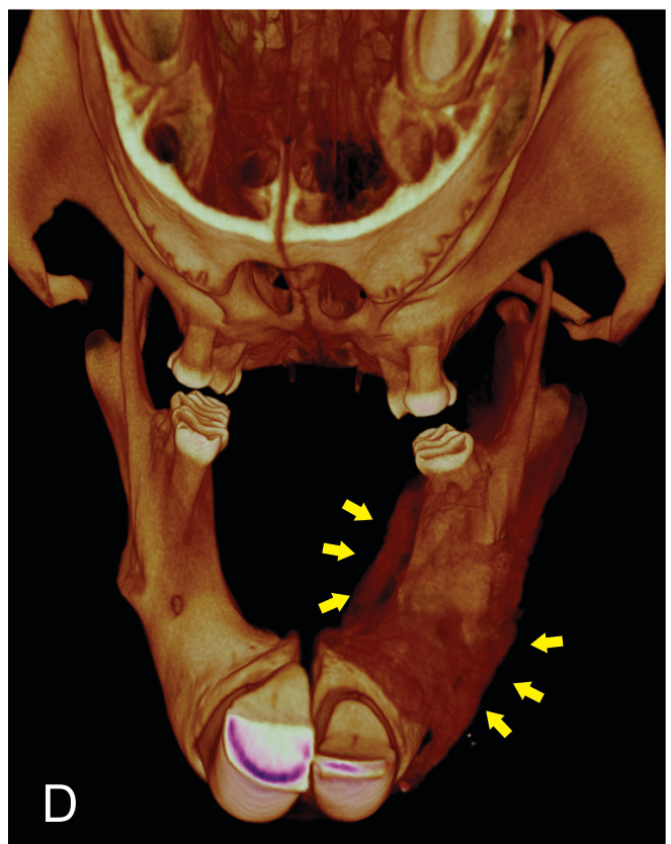
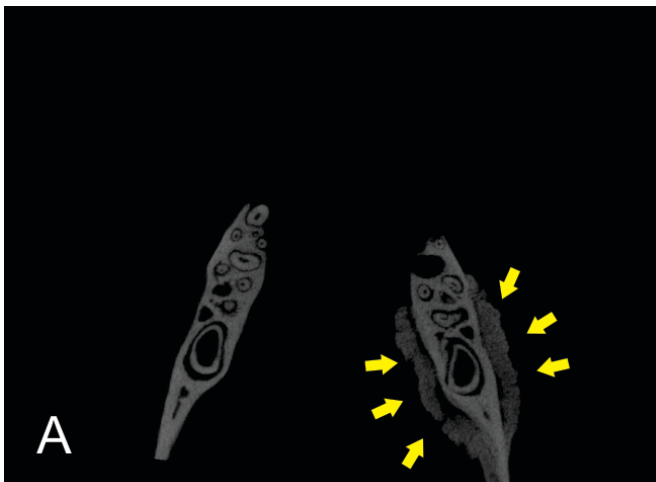
As figuras 15 a 19 apresentam exemplos das alterações ósseas encontradas nas avaliações microtomográficas (reconstruções multiplanares axiais, coronais e sagitais e reconstruções em 3D) dos animais estudados.











6. Discussão

7. Discussão

No presente estudo, a osteonecrose associada ao uso de bisfosfonatos foi induzida em ratos tratados com Zolendronato por 6 e 8 semanas. A associação da osteonecrose ao uso da medicação ficou evidenciada pelo fato de que nenhum animal do grupo controle apresentou sinais clínicos e microtomográficos da alteração. Além disso, o estudo demonstrou que a extração dentária nos animais tratados com bisfosfonatos foi um fator determinante para o surgimento da osteonecrose.

Os modelos em animais para o estudo da BRONJ têm sido investigados desde 2008 (Allen & Burr) e, desde então, diversos trabalhos (Abtahi *et al.*, 2012; Allen *et al.*, 2010; Aghaloo *et al.*, 2011; Ali-Erdem *et al.*, 2011; Bi *et al.*, 2010; Biasotto *et al.*, 2010; Huja *et al.*, 2011; Hokugo *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2010; Lopéz-Jornet *et al.*, 2010; Marino *et al.*, 2012; Pautke *et al.*, 2012; Perili *et al.*, 2010; Senel *et al.*, 2010; Sonis *et al.*, 2009) foram conduzidos com o intuito de responder perguntas relativas à dose em que os BFs causariam osteonecrose, etiopatogenia, fatores de risco e sinais imagenológicos da BRONJ. No entanto, modelos animais que venham a reproduzir fielmente todos os sinais observados na BRONJ em humanos ainda não foram desenvolvidos. Os principais fatores que dificultam a reprodutibilidade dos modelos supracitados incluem: a falta de padronização no tipo, dose e regimes de administração das medicações, uso de medicamentos associados, o uso de diferentes tipos de animais e o pequeno número amostral dos experimentos.

Existem muitos fatores que devem ser considerados na avaliação da adequação do modelo animal a ser utilizado como ferramenta de investigação no estudo de uma doença humana. Historicamente, roedores como os ratos têm sido os animais de escolha para o

estudo da maioria das doenças humanas. Eles se mostram adequados por sua facilidade de manuseio e cuidado, da alta capacidade de reprodução, e, acima de tudo, por sua similaridade genética com os seres humanos. Devido ao seu tamanho, os ratos são mais adequados para a pesquisa oral e periodontal (Sharma *et al.*, 2013). Estas razões motivaram a escolha do modelo animal que foi utilizado neste estudo. Apesar destas vantagens, trabalhar com modelo animal ainda apresenta algumas dificuldades, entre elas a principal é garantir a sobrevivência dos animais diante do uso do medicamento, das interações medicamentosas com os agentes anestésicos e sedativos e ainda as dificuldades inerentes ao confinamento propriamente dito. No presente estudo houve a perda de oito animais, sendo que cinco destes morreram entre a extração e a eutanásia e os outros três foram perdidos durante o processo de aquisição e/ou reconstrução das imagens.

O modelo animal ideal para o estudo da BRONJ deve obter uma descrição clínica da lesão a mais próxima possível da observada em humanos após o regime terapêutico com BFs (Sharma *et al.*, 2013). Neste contexto, a dose da medicação possui uma grande importância e deve ser compatível com a utilizada em seres humanos como proposto em nosso estudo. No caso do Ácido Zoledrônico, a dose usual para prevenção de complicações ósseas decorrentes de tratamentos de doenças malignas em humanos é de 4 mg/5ml para um indivíduo com 60kg, administrado de forma endovenosa e numa frequência mensal. A conversão para a equivalência em ratos toma por base que uma semana de vida do rato equivaleria a três meses de vida em humanos e, por este motivo, foi adotado o regime de 66 µg/kg, três vezes por semana, durante seis ou oito semanas. Este esquema simula, desta forma, o uso mensal de 4mg/5ml do ácido zoledrônico por 18 e 24 meses, respectivamente, que coincide com o tempo médio de uso desta medicação por pacientes.

Ao contrário de de outros estudos (Abtahi *et al.*, 2012; Ali-Erdem *et al.*, 2011; Bi *et al.*, 2010; Lopéz-Jornet *et al.*, 2010; Sonis *et al.*, 2009) que realizaram pesquisa da associação do BF com a dexametasona, este trabalho utilizou apenas o Ácido Zoledrônico para que sua capacidade de indução de osteonecrose pudesse ser avaliada isoladamente. Inicialmente, por ser uma droga muito utilizada, o estudo analisaria também o efeito do Pamidronato como indutor da osteonecrose nos ratos. No entanto, devido a dificuldade na aquisição da medicação e seu alto custo, optou-se por utilizar apenas o Zolendronato, visto que este é o bisfosfonato de maior potência e com maior potencial para o desenvolvimento da BRONJ (Ruggiero, 2011).

Assim como em humanos, os três fatores diagnósticos descritos por Ruggiero (2013) devem ser obrigatoriamente atendidos pelos modelos animais: exposição óssea clínica em maxila ou mandíbula que não cicatriza após 8 semanas (aproximadamente cinco dias de vida no rato), histórico de utilização de BP e ausência de radioterapia. O modelo animal desenvolvido neste estudo conseguiu reproduzir estes três quesitos e obter lesões semelhantes à BRONJ tanto em maxila quanto em mandíbula, evidenciadas clinicamente pela exposição óssea e feridas abertas nos locais de extração (Figura 10).

No presente estudo os animais que receberam zolendronato por 6 e 8 semanas e tiveram extrações dentárias apresentaram alterações ósseas decorrentes da osteonecrose. Este dado é corroborado pelos estudos em humanos, que consideram a extração dentária o fator de risco mais prevalente e consistente para o desenvolvimento da BRONJ em pacientes tratados com bisfosfonatos endovenosos (Badros *et al.*, 2006; Barasch *et al.*, 2011; Marx *et al.*, 2005). Neste estudo não foi encontrada exposição óssea nos animais não tratados e, por outro lado, a osteonecrose clínica estava presente em mais de 90% dos animais tratados com bisfosfonatos e que tinham sido submetidos a exodontias.

Apenas alguns trabalhos conseguiram reproduzir a BRONJ em modelos animais que tinham extrações dentárias e que faziam uso do Zolendronato, assim como no presente estudo (Biasotto *et al.*, 2010, Marino *et al.*, 2012, Pautke *et al.*, 2012). Biasotto *et al.* (2010) realizaram experimento com ratos em que, todos os animais que receberam o Ácido Zoledrônico e foram submetidos ao procedimento cirúrgico apresentaram exposição óssea. Marino *et al.* (2012) em estudo com 30 ratas que foram medicadas com zolendronato e foram submetidas à extração, também obtiveram achados com características similares à BRONJ observada em humanos. Pautke *et al.* (2012) realizaram experimento com mini-porcos medicados com zolendronato e que tiveram dentes extraídos e encontraram sinais de BRONJ avançada em todos animais do grupo de estudo. Todos animais do grupo-controle alcançaram a cicatrização completa da área cirúrgica em até duas semanas.

Em contrapartida, o estudo de Huja *et al.* (2011) não encontrou osteonecrose em animais que tiveram dentes extraídos. Estes autores realizaram o estudo com cães e avaliaram o efeito da medicação por um curto prazo de uso, o que pode explicar os resultados divergentes dos demais trabalhos, incluindo o do presente estudo. Nesta pesquisa a ocorrência das alterações ósseas foram restritas aos animais que tiveram dentes extraídos, o que reforça o papel das extrações e dos demais procedimentos cirúrgicos como fatores de risco para o desenvolvimento da BRONJ em modelos animais (Biasotto *et al.*, 2010, Marino *et al.*, 2012, Pautke *et al.*, 2012). Além disto, ainda que não se possa extrapolar os resultados dos modelos animais para humanos, a associação encontrada neste trabalho e nos demais com humanos da extração dentária como fator de risco para o desenvolvimento da BRONJ (Badros *et al.*, 2006; Barasch *et al.*, 2011; Marx *et al.*, 2005), revela a importância do papel do cirurgião-dentista no acompanhamento de pacientes em uso de bisfosfonatos, especialmente os endovenosos.

Os artigos que investigaram os achados imagenológicos em modelos animais são muito escassos e pouco específicos, com diferenças metodológicas em relação ao presente estudo, o que dificulta a comparação com os nossos resultados. Além disso, os estudos anteriores que utilizaram exames por imagem, não tiveram como objetivos principais a descrição das principais alterações imagenológicas encontradas nos animais tratados com bisfosfonatos. Biasotto *et al.* (2010) demonstraram que a tomografia computadorizada espiral revela irregularidade da margem óssea e a destruição do osso cortical. Sonis *et al.* (2009) também descreveram a má definição do rebordo alveolar na avaliação de radiografias convencionais. A esclerose e o sequestro ósseo foram observados por Bi *et al.* (2010) em imagens obtidas em microtomógrafo. Aghaloo *et al.* (2011) também utilizaram a microtomografia em seu experimento e referiram a presença de sequestros ósseos e a formação de osso alveolar periosteal.

As análises ósseas realizadas neste estudo foram qualitativas e baseadas na avaliação microtomográfica (reconstruções multiplanares e em 3D). Os resultados desta análise indicam que as alterações mais frequentemente encontradas nos animais tratados com Zolendronato que tiveram extrações foram as alterações osteolíticas com ou sem rompimento das corticais, bem como a reação periosteal. Estas lesões osteolíticas foram encontradas em 33% dos animais tratados por 6 semanas e em 55% dos animais tratados por 8 semanas. Em concordância com o presente trabalho, as lesões osteolíticas, são também encontradas em pacientes tratados com bisfosfonatos frequentemente (Arce *et al.*, 2009; Bedogni *et al.*, 2008; Morag *et al.*, 2009). Portanto, neste sentido, o modelo animal se aproxima do encontrado em humanos. Mais estudos são necessários para verificar o momento de aparecimento destas lesões e sua correlação com os aspectos clínicos e histológicos.

Este experimento não encontrou a formação de sequestros ósseos na maxila e na mandíbula. Pode-se hipotetizar que, pelo tempo de espera entre o término de medicação e a eutanásia, que foi bem mais longo do que o observado em outro estudo semelhante (Aghaloo *et al.*, 2011), o sequestro possa ter sido eliminado neste período. A metodologia inicial proposta tinha como objetivo realizar uma avaliação microtomográfica intermediária, que poderia evidenciar a presença do sequestro ósseo mas, em função da impossibilidade de utilização do microtomógrafo que se encontrava em manutenção nesta fase do experimento, fez-se necessário cancelar esta etapa.

Em relação à reação periosteal, além deste estudo, o único trabalho em animais que cita esta alteração, um sinal descrito como tardio em humanos (Haworth *et al.*, 2012) é o estudo de Aghaloo *et al.* (2011). Estes autores desenvolveram modelo que incluía o uso do zolendronato associado à doença periodontal avançada. Os animais foram medicados com a dose de 66 µg/kg, três vezes por semana e com o seu início três semanas antes da colocação da ligadura para indução da periodontite e o seu término, 12 semanas após a colocação da ligadura, perfazendo um total de 15 semanas de medicação. Apesar do menor tempo de uso da medicação em nosso experimento (seis e oito semanas), as imagens da reação periosteal obtidas nas amostras do estudo de Aghaloo *et al.* (2011) foram bem mais discretas do que as observadas neste trabalho (Figuras 15 A 19). Esta exacerbação da reação periosteal neste estudo pode ter ocorrido em função do tempo de espera entre o término da medicação e a eutanásia que nesta pesquisa foi de 34 a 48 dias, em contraste com o referido estudo, no qual a eutanásia ocorreu imediatamente após o término da medicação.

Foi possível observar ainda que as alterações ósseas encontradas foram mais evidentes na mandíbula que na maxila, assim como relatado em humanos onde esta proporção parece ser de 2:1 (Marx *et al.*, 2005; Ruggiero *et al.*, 2004; Ruggiero *et al.*,

2006). No entanto, devido ao tamanho da amostra, não foram realizadas estatísticas inferenciais para verificar estas diferenças entre maxila e mandíbula. Outros estudos com amostras maiores poderão evidenciar mais claramente os critérios para o desenvolvimento de osteonecrose em modelos animais.

Os exames imagenológicos têm sido exaustivamente estudados com vistas a auxiliar no prognóstico e no tratamento da BRONJ (Arce *et al.*, 2009; Chiandussi *et al.*, 2006; Guggenberger *et al.*, 2013; Stockmann *et al.*, 2010; Takaishi, 2010 *et al.*; Torres *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2012; Treister *et al.*, 2009; Treister *et al.*, 2010; Van den Wyngaert *et al.*, 2011). E, apesar dos avanços nos estudos com as radiografias convencionais (Ruggiero, 2013), com a ressonância magnética (Ruggiero, 2013) e com a cintilografia óssea (Chiandussi, 2006; O’Ryan, 2009), a tomografia computadorizada ainda é considerada o padrão-ouro para a detecção das alterações ósseas presentes na BRONJ (Bianchi *et al.*, 2007; Fatterpekar *et al.*, 2011).

Já a microtomografia computadorizada, que é um exame de alta resolução que permite excelente avaliação dos tecidos ósseos, pode ser considerada o melhor método de imagem para estudos com modelos animais (Sharma *et al.*, 2013). Os únicos trabalhos que utilizaram a microtomografia para avaliação óssea em modelos animais foram os estudos de Bi *et al.* (2010) e de Aghaloo *et al.* (2011). Bi *et al.* (2010) escanearam e reconstruíram as suas imagens utilizando um sistema de microTC (eXplore MS, GE Medical Systems, London, Ontario, Canada) com 8 μ m de voxels isotrópicos. As imagens bidimensionais e tridimensionais foram reconstruídas utilizando o MicroView (GE Medical Systems). Este modelo animal conseguiu demonstrar, por meio da microTC, sinais observados em humanos com BRONJ como a esclerose, o sequestro ósseo e o osso alveolar radiopaco. Já Aghaloo *et al.* (2011) realizaram o escaneamento (μ CT 40; Scanco Medical AG, Basserdorf, Switzerland) em resolução de 16 μ m e os dados volumétricos

foram convertidos para o formato DICOM e importados para o *software Dolphin Imaging* (Chatsworth, CA, USA) para gerar as imagens multiplanares e tridimensionais. O sequestro óssea e a reação periosteal estavam presentes em 47% dos animais que foram medicados com zolendronato e que tinham periodontite avançada. A espessura da cortical óssea mostrou-se significativamente aumentada neste mesmo grupo de animais. O presente estudo utilizou a microTC (microTC *in vivo* Skyscan 1076 (Skyscan, Aartselaar, Bélgica) em voxel isotrópico de 18 x 18 x 18µm. As reconstruções bidimensionais foram realizadas com o software NRecon (V 1.6.9, versão 64 bit com aceleração GPU, Skyscan, Kontich, Bélgica) e as tridimensionais no CTvox (V 1.5.0, versão 64 bit, Skyscan, Kontich, Bélgica). A reação periosteal foi encontrada em 100% dos ratos tratados com BF e com extração em mandíbula. Em maxila, a reação periosteal também foi encontrada, porém em menor número de casos. Além das imagens qualitativas, a microTC pode ainda oferecer dados métricos precisos tais como a densidade mineral óssea (DMO), análise do osso cortical e trabecular e o volume de hidroxiapatita em miligramas por unidade de volume (mgHA/cc), no entanto, nenhum dos estudos citados realizaram tais medições. Por ser o aumento da densidade óssea a principal alteração óssea relatada em humanos (Arce *et al*, 2009; Chiandussi *et al*, 2006), estas análises de densidade mineral óssea nos modelos animais podem vir a confirmar este importante achado.

O estadiamento da BRONJ envolve achados clínicos e sintomas que são gradativos e caminham desde a ausência de exposição até à presença de osso exposto associado à dor, infecção, fraturas patológicas, fistulas extraorais e osteólises (Ruggiero, 2013). No entanto, nenhum estudo com humanos ou modelo animal foi capaz de qualificar e comprovar uma equivalência entre os estádios da BRONJ e os achados imagenológicos. E, apesar de vários achados que estão presentes nos estádios mais avançados da

doença terem sido observados nos animais (presença de grandes áreas osteolíticas, reação periosteal, e fístulas extraorais) deste trabalho, não foi possível reproduzir o estadiamento das lesões no modelo.

Por outro lado, o presente estudo conseguiu obter um modelo animal de indução de osteonecrose associada ao uso de bisfosfonatos factível, confiável e reproduzível, com dose de medicação e tempo de uso comparável aos utilizados no tratamento de metástases ósseas, o que pode servir como ponto de partida para futuros estudos em animais e humanos. Estas similaridades permitem uma aproximação clínica significativa, com reprodução de alterações imagenológicas decorrentes da utilização destas medicações em humanos.

8. Conclusões

9. Conclusões

- Animais tratados com Zolendronato por 6 e 8 semanas, que tiveram dentes extraídos, desenvolveram osteonecrose clínica e alterações ósseas evidenciadas por microtomografia computadorizada.
- As principais alterações clínicas observadas foram exposição óssea, com feridas abertas no local da extração e fístula extraoral.
- As alterações imagenológicas verificadas por meio da microtomografia foram lesões osteolíticas, com ou sem rompimento da cortical e reação periosteal/bicorticalização. Sequestros ósseos não foram encontrados.
- Os resultados parecem indicar que quanto maior o tempo de exposição ao fármaco, maior a incidência de lesões.
- A BRONJ foi mais prevalente nos animais submetidos à extração.
- As lesões foram mais prevalente em mandíbula que em maxila.
- O modelo animal proposto neste estudo foi capaz de desenvolver lesões semelhantes à BRONJ em ratos tratados com bisfosfonato e que foram submetidos à exodontia.

Referências bibliográficas

Referências bibliográficas¹

Abtahi J, Agholme F, Sandberg O, Aspenberg P. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw in a rat model arises first after the bone has become exposed. No primary necrosis in unexposed bone. *J Oral Pathol Med.* 2012;41(6):494-9.

Advisory Task Force on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65(3):369-76.

Aghaloo TL, Felsenfeld AL, Tetradis S. Osteonecrosis of the jaw in a patient on Denosumab. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(5):959-63.

Aghaloo TL, Kang B, Sung EC, Shoff M, Ronconi M, Gotcher JE, et al. Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. *J Bone Miner Res.* 2011;26(8):1871-82.

Allen MR, Burr DB. Mandible matrix necrosis in beagle dogs after 3 years of daily oral bisphosphonate treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66(5):987-94.

¹ De acordo com *International Committee of Medical Journal Editors*. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. *New Engl Med* 1997;336(4):309-15. Abreviatura de periódicos segundo Base de Dados MEDLINE

Allen M, Ruggiero S. Higher bone matrix density exists in only a subset of patients with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67:1373–7.

Allen MR, Kubek DJ, Burr DB. Cancer treatment dosing regimens of zoledronic acid result in near-complete suppression of mandible intracortical bone remodeling in beagle dogs. *J Bone Miner Res*. 2010;25(1):98-105.

Allen M, Pandya B, Ruggiero S. Lack of correlation between duration of osteonecrosis of the jaw and sequestra tissue morphology: what it tells us about the condition and what it means for future studies. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68: 2730–4.

Ali-Erdem M, Burak-Cankaya A, Cemil-Isler S, Demircan S, Soluk M, Kasapoglu C, 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;16(7):879-83.

Arce K, Assael LA, Weissman JL, Markiewicz MR. Imaging findings in bisphosphonate-related osteonecrosis of jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67(5):75-84.

Badros A, Weikel D, Salama A. Osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma patients: clinical features and risk factors. *J Clin Oncol* 2006;24:945–52.

Bagan J, Jimenez Y, Gomez D, Sirera R, Poveda R, Scully C. Collagen telopeptide (serum CTX) and its relationship with size and number of lesions in osteonecrosis of the jaws in cancer patients on intravenous bisphosphonates. *Oral Oncol*. 2008;44(11):1088–9.

Barasch A, Cunha-Cruz J, Curro FA, Hujoel P, Sung AH, Vena D, et al. Risk factors for osteonecrosis of the jaws: a case-control study from the CONDOR dental PBRN. *J Dent Res* 2011; 90(4):439–44.

Barragan-Adjemian C, Lausten L, Ang DB, Johnson M, Katz J, Bonewald LF. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: model and diagnosis with cone beam computerized tomography. *Cells Tissues Organs*. 2009;189(1-4):284-8.

Bedogni A, Blandamura S, Lokmic Z, Palumbo C, Ragazzo M, Ferrari F, et al. Bisphosphonate-associated jawbone osteonecrosis: a correlation between imaging techniques and histopathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 Mar;105(3):358-64.

Bentley MD, Ortiz MC, Ritman EL, Romero JC. The use of microcomputed tomography to study microvasculature in small rodents. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002;282(5):1267–1279.

Bi Y, Gao Y, Ehrchiou D, Cao C, Kikuri T, Le A, Shi S, et al. Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *Am J Pathol*. 2010 Jul;177(1):280-90.

Bianchi SD, Scoletta M, Cassione FB, Migliaretti G, Mozzati M. Computerized tomographic findings in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw in patients with cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104(2):249-258.

Biasotto M, Chiandussi S, Zacchigna S, Moimas S, Dore F, Pozzato G, et al. A novel animal model to study non-spontaneous bisphosphonates osteonecrosis of jaw. *J Oral Pathol Med.* 2010;39(5):390-6.

Chiandussi S, Biasotto M, Dore F, Cavalli F, Cova MA, Di Lenarda R. Clinical and diagnostic imaging of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Dentomaxillofac Radiol* 2006;35(4):236-243.

Dannemann C, Zwahlen R, Gratz K.W. Clinical experiences with bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaws. *Swiss Med Wkly.* 2006;136(31-32):504-9.

Dunn PM. Wilhelm Conrad Röntgen (1845-1923), the discovery of x rays and perinatal diagnosis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2001;84(2):F138-9.

Fatterpekar GM, Emmrich JV, Eloy JA, Aggarwal A. Bone-within-bone appearance: a red flag for bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. *J Comput Assist Tomogr* 2011;35(5):553-6.

Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res.* 1989;4(1): 3–11.

Fleisher KE, Welch G, Kottal S, Craig RG, Saxena D, Glickman RS. Predicting risk for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: CTX versus radiographic markers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;110(4):509-16.

Ganapathy N, Gokulnathan S, Balan N, Maheswaran T, Venkatesan. Bisphosphonates: An update. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012;4(Suppl 2):S410-3.

Guggenberger R, Fischer DR, Metzler P, Andreisek G, Nanz D, Jacobsen C, et al. Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaw: Comparison of Disease Extent on Contrast-Enhanced MR Imaging, [18F] Fluoride PET/CT, and Conebeam CT imaging. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2013;34(6):1242-7.

Guldberg RE, Ballock RT, Boyan BD, Duvall CL, Lin AS, Nagaraja S, et al. Analyzing bone, blood vessels, and biomaterials with microcomputed tomography. *IEEE Eng Med Biol Mag.* 2003;22(5): 77–83.

Guldberg RE, Lin AS, Coleman R, Robertson G, Duvall C. Microcomputed tomography imaging of skeletal development and growth. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2004;72(3): 250–259.

Gutta R, Louis PJ. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws: science and rationale. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;104(2):186-93.

Haworth AE, Webb J. Skeletal complications of bisphosphonate use: what the radiologist should know. *Br J Radiol* 2012;85(1018):1333-42.

Hoefert S, Schmitz I, Tannapfel A, Eufinger H. Importance of microcracks in etiology of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a possible pathogenetic model of

symptomatic and non-symptomatic osteonecrosis of the jaw based on scanning electron microscopy findings. *Clin Oral Investig*. 2010;14(3):271-84.

Hoff AO, Toth BB, Altundag K, Guarneri V, Adamus A, Nooka AK, et al. Osteonecrosis of the jaw in patients receiving intravenous bisphosphonate therapy. *J Clin Oncol* 2006;24(16):8528.

Hokugo A, Christensen R, Chung E, Sung E, Felsenfeld AL, Sayre JW, et al. Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with vitamin D deficiency in rats. *J Bone Miner Res*. 2010;25(6):1337-49.

Holdsworth DW, Thornton MM. Micro-CT in small animal and specimen imaging. *Trends Biotechnol*. 2002;20(8): 34-39.

Hounsfield GN. Computerized transverse axial scanning (tomography). 1. Description of system. *Br J Radiol*. 1973;46(552):1016-22.

Huja SS, Mason A, Fenell CE, Mo X, Hueni S, D'Atri AM, 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;69(2):418-27.

Hutchinson M, O'Ryan F, Chavez V, Lathon PV, Sanchez G, Hatcher DC, et al. Radiographic findings in bisphosphonate-treated patients with stage 0 disease in the absence of bone exposure. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68:2232-2240.

Janovská Z. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. A severe side effect of bisphosphonate therapy. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2012;55(3):111-5.

Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res*. 2007;22(10):1479-91

Kobayashi Y, Hiraga T, Ueda A, Wang L, Matsumoto-Nakano M, Hata K, 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;28(2):165-75.

Kuhn JL, Goldstein SA, Feldkamp LA, Goulet RW, Jesion G. Evaluation of a microcomputed tomography system to study trabecular bone structure. *J Orthop Res*. 1990;8(6): 833–842.

Kumar SK, Gorur A, Schaudinn C, Shuler CF, Costerton JW, Sedghizadeh PP. The role of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaw associated with bisphosphonate therapy. *Curr Osteoporos Rep*. 2010;8(1):40-8.

Kunchur R, Need A, Hughes T, Goss A. Clinical investigation of C-terminal cross-linking telopeptide test in prevention and management of bisphosphonate -associated osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxil- lofac Surg* 2009;67(6):1167–73.

Kwon YD, Kim DY, Obe JY, Yoo JY, Walter C. Correlation between serum C-terminal cross-linking telopeptide of type 1 collagen and staging of oral bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67(12):2644–8.

Kyrgidis A, Vahtsevanos K, Koloutsos G, Andreadis C, Boukovinas I, Teleioudis Z, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a case-control study of risk factors in breast cancer patients. *J Clin Oncol*. 2008;26(28):4634-8.

Landesberg R, Cozin M, Cremers S, Woo V, Kousteri S, Sinha S, et al. Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008;66(5):839-47.

Leite AF, Figueiredo PT, Melo NS, Acevedo AC, Cavalcanti MG, Paula LM, et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. Report of a case and literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;102(1):14-21.

Lesclous P, Abi Najm S, Carrel JP, Baroukh B, Lombardi T, Willi JP, et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a key role of inflammation? *Bone*. 2009;45(5):843-52.

López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Molina-Miñano F, Gómez-García F, Vicente-Ortega V. An experimental study of bisphosphonate-induced jaws osteonecrosis in Sprague-Dawley rats. *J Oral Pathol Med*. 2010;39(9):697-702.

Marino KL, Zakhary I, Abdelsayed RA, Carter JA, O'Neill JC, Khashaba RM, et al. Development of a rat model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *J Oral Implantol*. 2012;38 Spec No:511-8.

Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003;61(9):1115-7.

Marx R, Sawatari Y, Fortin M. Bisphosphonate- induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63:1567–75.

Marx RE, Cillo JE Jr, Ulloa JJ. Oral bisphosphonate- induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65(12):2397–410.

Mavrokokki T, Cheng A, Stein B, Goss A. Nature and frequency of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in Australia. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007;65(3):415-23.

Morag Y, Morag-Hezroni M, Jamadar DA, Ward BB, Jacobson JA, Zwetchkenbaum SR, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a pictorial review. *Radiographics* 2009;29(7):1971-84.

Orozco C, Maalouf NM. Safety of bisphosphonates. *Rheum Dis Clin North Am*. 2012;38(4):681-705.

O’Ryan FS, Khoury S, Liao W, Han MM, Hui RL, Baer D, et al. Intravenous bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: bone scintigraphy as an early indicator. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67(7):1363–72.

Papapetrou PD. Bisphosphonate-associated adverse events. *Hormones (Athens)*. 2009;8(2):96-110.

Paulus MJ, Gleason SS, Kennel SJ, Hunsicker PR, Johnson DK. High resolution X-ray computed tomography: an emerging tool for small animal cancer research. *Neoplasia*. 2000;2(1/2): 62–70.

Pautke C, Kreutzer K, Weitz J, Knödler M, Münzel D, Wexel G, et al. Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw: A minipig large animal model. *Bone*. 2012;51(3):592-9.

Pazianas M, Abrahamsen B. Safety of bisphosphonates. *Bone*. 2011;49(1):103-10.

Perilli E, Le V, Ma B, Salmon P, Reynolds K, Fazzalari NL. Detecting early bone changes using in vivo micro-CT in ovariectomized, zoledronic acid-treated, and sham-operated rats. *Osteoporos Int*. 2010; 21(8):1371-82.

Rosen HN, Moses AC, Garber J, Ross DS, Lee SL, Greenspan SL. Utility of biochemical markers of bone turnover in the follow-up of patients treated with bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* 1998;63(5):363–8.

Rosen HN, Moses AC, Garber J, Iloputaife ID, Ross DS, Lee SL, Greenspan SL. Serum CTX: a new marker of bone resorption that shows treatment effect more often than other markers because of low coefficient of variability and large changes with bisphosphonate therapy. *Calcif Tissue Int* 2000;66(2):100–3.

Rugani P, Luschin G, Jakse N, Kirnbauer B, Lang U, Acham S. Prevalence of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw after intravenous zoledronate infusions in patients with early breast cancer. *Clin Oral Investig*. 2013; Jun 10. [Epub ahead of print]

Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associate with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004;62(5):527-34.

Ruggiero SL, Fantasia J, Carlson E. Bisphosphonate- related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102(4):433–41.

Ruggiero SL, Drew SJ. Osteonecrosis of the jaws and bisphosphonate therapy. *J Dent Res*. 2007;86(11):1013-21.

Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B; Task Force on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw - 2009 update. *Aust Endod J*. 2009;35(3):119-30.

Ruggiero SL. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: an overview. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1218:38-46.

Ruggiero SL. Emerging concepts in the management and treatment of osteonecrosis of the jaw. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2013 Feb;25(1):11-20.

Sarasquete ME, García-Sanz R, Marín L, Alcoceba M, Chillón MC, Balanzategui A, et al. BRONJ is associated with polymorphisms of the cytochrome P450 CYP2C8 in multiple myeloma: a genome-wide single nucleotide analysis. *Blood* 2008;112(7): 2709-12.

Scheper MA, Badros A, Chaisuparat R, Cullen KJ, Meiller TF. Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Br J Haematol.* 2009;144(5):667-76.

Senel FC, Duman MK, Muci E, Cankaya M, Pampu AA, Ersoz S, et al. Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109(3):385-91.

Sharma D, Hamlet S, Petcu E, Ivanovski S. Animal models for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws - an appraisal. *Oral Dis.* 2013; Jan 11. [Epub ahead of print]

Sonis ST, Watkins BA, Lyng GD, Lerman MA, Anderson KC. Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. *Oral Oncol.* 2009;45(2):164-72.

Stockmann P, Hinkmann FM, Lell MM, Fenner M, Vairaktaris E, Neukam FW, et al. Panoramic radiograph, computed tomography or magnetic resonance imaging. Which

imaging technique should be preferred in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw? A prospective clinical study. *Clin Oral Investig* 2010;14(3):311-7.

Stopeck, A., J. Body & Y. Fujiwara. 2009. Denosumab versus zoledronic acid for the treatment of breast cancer patients with bone metastases: results of a randomized phase 3 study. *Eur. J. Cancer Suppl.* 7: 2.

Takaishi Y, Ikeo T, Nakajima M, Miki T, Fujita T. A pilot case-control study on the alveolar bone density measurement in risk assessment for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Osteoporos Int* 2010;21(5):815-825.

Torres SR, Chen CS, Leroux BG, Lee PP, Hollender LG, Schubert MM. Fractal dimension evaluation of cone beam computed tomography in patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Dentomaxillofac Radiol* 2011;40(8):501-505.

Torres SR, Chen CS, Leroux BG, Lee PP, Hollender LG, Santos EC, et al. Mandibular cortical bone evaluation on cone beam computed tomography images of patients with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012;113(5):695-703.

Treister N, Sheehy N, Bae EH, Friedland B, Lerman M, Woo S. Dental panoramic radiographic evaluation in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Oral Dis* 2009;15(1):88-92.

Treister NS, Friedland B, Woo SB. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2010;109(5):753-64.

Van den Wyngaert T, Huizing MT, Fossion E, Vermorken JB. Prognostic value of bone scintigraphy in cancer patients with osteonecrosis of the jaw. Clin Nucl Med 2011;36(1):17-20.

Walter C, Grötz KA, Kunkel M, Al-Nawas B. Prevalence of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw within the field of osteonecrosis. Support Care Cancer. 2007;15(2):197-202.

Weinstein RS, Roberson PK, Manolagas SC. Giant osteoclast formation and long-term oral bisphosphonate therapy. N Engl J Med. 2009;360(1):53-62.

Woo SB, Hellstein JW, Kalmar JR. Narrative [corrected] review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. Ann Intern Med. 2006;144(10):753-61.

Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcène A, Devy L, Foidart JM, et al. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. J. Pharm. Exp. Ther. 2002;302(3):1055-61.

ANEXO

ANEXO



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 19 de janeiro de 2012.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"ANÁLISE POR MICROTOMOGRÁFIA DA MAXILA E MANDÍBULA DE RATOS EM TRATAMENTO COM BISFOSFOMATOS."**, UnBDOC n.º 41597/2010, sob responsabilidade do Prof. André Ferreira Leite, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Aline Pic-Taylor
Profa. Aline Pic-Taylor
Coordenadora da CEUA

APÊNDICE

