

NATHÁLIA FERRARE PINTO

**OSTEONECROSE POR USO DE MEDICAMENTOS:
ESTUDO *IN VIVO* E REVISÃO SISTEMÁTICA**

Brasília

2021

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DAS SAÚDE

NATHÁLIA FERRARE PINTO

**OSTEONECROSE POR USO DE MEDICAMENTOS:
ESTUDO *IN VIVO* E REVISÃO SISTEMÁTICA**

**Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília.**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Tadeu de Souza Figueiredo

Brasília

2021

NATHÁLIA FERRARE PINTO

**OSTEONECROSE POR USO DE MEDICAMENTOS:
ESTUDO IN VIVO E REVISÃO SISTEMÁTICA**

**Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília.**

Aprovada em 26 de fevereiro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Paulo Tadeu de Souza Figueiredo (presidente)
Universidade de Brasília**

**Prof. Dra. Maria Alves Garcia Santos Silva
Universidade Federal de Goiás**

**Prof. Dra. Maria Augusta Visconti Rocha Pinto
Universidade Federal do Rio de Janeiro**

**Prof. Dr. André Ferreira Leite
Universidade Brasília**

**Prof. Dra. Nilce Santos de Melo (Suplente)
Universidade de Brasília**

Com amor, alegria e gratidão, dedico aos meus pais e avós.

Com saudades, à Vó Floreny.

AGRADECIMENTOS

À minha **família**, por estar sempre comigo, me apoiando e incentivando.

Aos meus orientadores, **Paulo Tadeu de Souza Figueiredo** e **André Ferreira Leite**, que me orientaram nos primeiros passos na vida acadêmica ainda na graduação e aceitaram me orientar novamente no doutorado, por me incentivarem no caminho da ciência, pelo exemplo, pela confiança, pelo carinho e pela sempre alegre forma de trabalhar.

A professora **Nilce Santos de Melo**, pelo exemplo de amor à ciência e à docência. A todos os **professores das disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**, por todos os ensinamentos compartilhados.

Aos alunos de mestrado, **Danielle Leal Vieira**, **Raíza Querrer**, **Andreia Maria Rocha Moreira**, **Túlio de Lucena Pires** e **Josy Lorena Peres Vilarinho** pela convivência, companheirismo e dedicação durante a realização dos nossos trabalhos de pesquisa, pela companhia alegre nos momentos de cansaço e cuidados dos animais. À aluna de Iniciação Científica **Larissa Meireles Rodrigues**, pela oportunidade de orientá-la.

Aos **veterinários** e **técnicos do laboratório da Faculdade de Ciências da Saúde**, por terem cuidado dos animais deste estudo com toda a dedicação e terem dado o suporte necessário para que os experimentos pudessem ser realizados.

Às professoras **Maria Alves Garcia Santos Silva** e **Maria Augusta Visconti Rocha Pinto**, por gentil e prontamente terem aceitado o convite para comporem a banca examinadora na defesa desta tese.

Ao professor **Antônio Carlos de Oliveira Ruellas**, que é um grande exemplo de professor e Ortodontista, pela gentileza, pela paciência e por ter me ensinado muito sobre Ortodontia e análise tridimensional.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela bolsa de estudos concedida. À **Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF)**, pelo financiamento deste estudo e de visita técnica.

A todos, o meu sincero agradecimento.

“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”

(João Guimarães Rosa)

RESUMO

O osteonecrose por uso de medicamentos (MRONJ) é um efeito adverso do uso de medicamentos antirreabsortivos e antiangiogênicos, como os bisfosfonatos e o denosumabe, que afeta gravemente o osso maxilomandibular. A patofisiologia da MRONJ ainda não foi completamente elucidada. Objetivos: Avaliar as alterações clínicas e imaginológicas precoces no osso mandibular em modelo animal de osteonecrose por uso de medicamentos e revisar sistematicamente a literatura disponível sobre os aspectos clínicos e imaginológicos da osteonecrose por uso de medicamentos, comparando bisfosfonatos e denosumabe. Método: Duas metodologias foram utilizadas nesta tese, experimental em modelo animal e revisão sistemática. Na primeira, ratas Wistar foram divididas em dois grupos: submetidas à administração de ácido zoledrônico (ZA) e controle. Extrações dentárias dos primeiros molares inferiores esquerdos foram realizadas em todos os animais. As alterações foram avaliadas por microtomografia (microTC) em três momentos: inicial (T0), após a administração de medicamentos (T1) e após extração dentária (T2). Os seguintes parâmetros ósseos foram calculados: densidade mineral óssea (BMD), espessura trabecular (Tb.Th) e fração de volume ósseo (BV/TV). A comparação de parâmetros ósseos quantitativos entre os diferentes lados e fases experimentais de ambos os grupos estudados foi realizada pela análise de variância. Na segunda metodologia, a revisão sistemática seguiu o Manual de Revisão do Instituto Joanna Briggs, e as pesquisas foram realizadas nas bases de dados PubMed, Cochrane, Scopus, Web of Science e Lilacs e na literatura cinzenta (ProQuest, Open Gray e Google Scholar). Resultados: No estudo experimental, de T0 a T1, Tb.Th e BV/TV aumentaram, e em T2, os valores médios foram maiores no grupo ZA do que no grupo de controle. A densidade mineral óssea aumentou ao longo das diferentes fases de ambos os grupos. Nenhum dos animais do grupo controle desenvolveu MRONJ e, no grupo ZA, 76% apresentaram exposição óssea. Na revisão sistemática, as buscas resultaram em 7535 artigos que foram avaliados criticamente. Com base nos critérios de seleção, sete estudos foram incluídos na revisão: cinco estudos transversais e dois ensaios clínicos randomizados. Um total de 7.755 pacientes compuseram a população final. Um aumento no sequestro ósseo, na lise óssea cortical e na densidade óssea foi observado em paciente com MRONJ relacionado com bisfosfonatos, enquanto

sequestro ósseo maior, reações periosteais mais frequentes e realce do canal mandibular foram observados em paciente com MRONJ relacionada ao denosumabe. Conclusão: As alterações ósseas em exames de imagem ocorrem precocemente em modelo animal de osteonecrose por uso de medicamentos da classe dos bisfosfonatos, e as alterações clínicas foram observadas tardiamente após extração dentária. Apesar da semelhança clínica, os aspectos imaginológicos da osteonecrose causada por bisfosfonatos e denosumabe não são similares. Mais estudos são necessários para caracterizar as alterações clínicas e imaginológicas da MRONJ.

Palavras-chave: Osteonecrose, bisfosfonatos, denosumabe, modelos animais, revisão sistemática

ABSTRACT

Medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) is an adverse effect of the use of antiresorptive and antiangiogenic drugs, such as bisphosphonates and denosumab, which severely affects the maxillomandibular bone. The pathophysiology of MRONJ has not been fully elucidated. Objectives: To evaluate early changes in the mandibular bone in an animal model of medication-related osteonecrosis of the jaw and systematically review the available literature on the clinical and imaging aspects of medication-related osteonecrosis of the jaw, comparing bisphosphonates and denosumab. Methods: Two methodologies were used in this thesis, experimental in an animal model and systematic review. In the first, rats were divided into two groups: exposed to the administration of zoledronic acid (ZA) and control. Dental extractions of the first left lower molars were performed in all animals. Bony changes were evaluated by microtomography (microCT) in three time points: at baseline (T0), after drug administration (T1) and after tooth extraction (T2). The following bone parameters were calculated: bone mineral density (BMD), trabecular thickness (Tb.Th) and bone volume proportion (BV/TV). The comparison of quantitative bone parameters among the different sides and experimental phases of both studied groups were performed by ANOVA-factorial. In the second methodology, the systematic review followed the Joanna Briggs Review's Manual, and the searches were performed on PubMed, Cochrane, Scopus, Web of Science and Lilacs databases and on the gray literature (ProQuest, Open Gray and Google Scholar). Results: In the experimental study, none of the animals in the control group developed MRONJ and, in the ZA group, 76% presented bone exposure. From T0 to T1, Tb.Th and BV/TV increased, and in T2, the mean values were higher in the ZA group than in the control group. BMD increased throughout the different phases of both groups. In the systematic review, the searches resulted in 7535 articles that were critically assessed. Based on the selection criteria, seven studies were included in the review: five cross-sectional studies and two randomized clinical trials. A total of 7755 patients composed the final population. An increase in bone sequestration, cortical bone lysis and bone density was noted in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw, while larger bone sequestration, more frequent periosteal reactions and mandibular canal enhancement were observed in denosumab-related osteonecrosis of the jaw. Conclusion: Imaging bone changes

occurred early in an animal model of medication-related osteonecrosis of the jaw, and clinical changes were observed later after tooth extraction. Despite the clinical similarity, the imaging aspects of bisphosphonate-related and denosumab-related osteonecrosis of the jaw are not similar. Further studies are necessary to characterize the MRONJ clinical and imaging changes.

Keywords: Osteonecrosis, bisphosphonates, denosumab, animal models, systematic review

LISTA DE FIGURAS

METODOLOGIA DO ESTUDO EXPERIMENTAL

- Figura 1** Posicionamento dos animais no equipamento SkyScan em decúbito ventral para obtenção das imagens microtomográficas (A), imagem de microCT bidimensional utilizada para conferência do posicionamento do animal no equipamento e definição da região a ser examinada (B)..... 26
- Figura 2** Protocolo experimental: aclimatação por 14 dias, avaliação microtomográfica e clínica em três tempos (T0, T1 e T2), período de administração de ácido zoledrônico e placebo com duração de 3 semanas entre T0 e T1, cirurgia de extração de primeiros molares inferiores do lado esquerdo logo após T1, período de espera e observação com duração de 6 semanas entre T1 e T2..... 27
- Figura 3** Reconstrução 3D ilustrando o Volume de Interesse (VOI) selecionado no osso mandibular. A – Vista lateral 3D mostrando o VOI selecionado. B – Imagem coronal do VOI.... 28

RESULTADOS DO ESTUDO EXPERIMENTAL

- Figura 4** Comparação dos valores médios e intervalos de confiança de todos os parâmetros ósseos microtomográficos quantitativos: Densidade Mineral Óssea – BMD (A), Espessura Trabecular – Tb.Th (B) e Proporção de Volume Ósseo – BV/TV (C). Todos esses parâmetros ósseos já estavam alterados após a administração de zolendronato e antes do trauma local (T2) 36
- Figura 5** Imagens de reconstrução multiplanar (A, C e D) e imagem tridimensional (B) de microTC mostrando lesões osteolíticas e reação periosteal em um animal do grupo ácido

	zoledrônico (setas brancas). A – imagem axial. B – vista frontal 3D. C – imagem coronal. D – imagem sagital	37
Figura 6	Fotografias clínicas mostrando exposição óssea (A) e abscesso (B) em animais do grupo ácido zoledrônico.....	38

RESULTADOS DA REVISÃO SISTEMÁTICA

Figura 7	Fluxograma da busca na literatura e da seleção de estudos, adaptado do PRISMA (1). De 5.225 artigos (após a remoção das dos duplicados), 62 foram selecionados na fase 1 de seleção do estudo (após avaliação dos títulos e resumos) e 7 foram incluídos na fase 2 (após leitura do artigo completo)	46
Figura 8	Resumo dos resultados. Os principais resultados de cada estudo incluído (representados no centro por seus números de referência dentro dos diamantes) são apresentados. As diferenças entre a BRONJ e a DRONJ são resumidas de acordo com os achados imaginológicos ou clínicos. BRONJ = osteonecrose por uso de bisfosfonato; DRONJ = osteonecrose por uso de denosumabe; TC = Achados observados em exames de Tomografia Computadorizada; PR = Achados observados em radiografias panorâmicas; * = significância estatística observada no estudo $p < 0,05$	47

LISTA DE QUADROS E TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Quadro 1	Estadiamento da MRONJ	20
-----------------	-----------------------------	----

RESULTADOS DO ESTUDO EXPERIMENTAL

Tabela 1	Comparação dos parâmetros do osso trabecular no lado direito (área não afetada) entre o grupo ZA e o grupo controle	34
Tabela 2	Comparação dos parâmetros do osso trabecular no lado esquerdo (área afetada) entre o grupo ZA e o grupo controle	35

RESULTADOS DA REVISÃO SISTEMÁTICA

Tabela 3	Características descritivas dos artigos incluídos (n=7)	48
-----------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MRONJ	Osteonecrose por uso de medicamentos
BFs/BF	Bisfosfonatos/Bisfosfonato
DMAb	Denosumabe
BRONJ	Osteonecrose por uso de bisfosfonatos
DRONJ	Osteonecrose por uso de denosumabe
ZA	Ácido zoledrônico
RANK	Fator nuclear Kappa B
TNF	Fator de necrose tumoral
TC	Tomografia computadorizada
TCFC	Tomografia computadorizada de feixe cônico
MicroTC	Microtomografia computadorizada
VOI	Volume de interesse
BMD	Densidade mineral óssea
Tb.Th	Espessura trabecular
BV/TV	Fração de volume ósseo
ANOVA	Análise de Variância
OSF	<i>Open Science Framework</i>
PRISMA	<i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses</i>
MAStARI	<i>Meta-Analysis of Statistics Assessment and Review Instrument</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
3	HIPÓTESES	23
4	OBJETIVOS	24
5	METODOLOGIA DO ESTUDO EXPERIMENTAL	25
6	RESULTADOS DO ESTUDO EXPERIMENTAL	31
7	METODOLOGIA DA REVISÃO SISTEMÁTICA	39
8	RESULTADOS DA REVISÃO SISTEMÁTICA	42
9	DISCUSSÃO	51
10	PUBLICAÇÕES	56
11	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
	APÊNDICES	82
	ANEXOS	96

1 INTRODUÇÃO

O uso de determinados medicamentos antirreabsortivos e antiangiogênicos é relacionado a um efeito adverso grave, a osteonecrose por uso de medicamentos (MRONJ) (1). Os primeiros casos relatados desta condição foram associados ao uso de bisfosfonatos (BFs) (2). Posteriormente, foi observado o acontecimento da osteonecrose relacionada a outros medicamentos, como o denosumabe (DMAb) (3).

Os bisfosfonatos e o denosumabe são drogas antirreabsortivas, indicadas no tratamento da osteoporose, de metástases ósseas e outras doenças que envolvem reabsorção e enfraquecimento ósseo (4-6). Esses medicamentos inibem a atividade de osteoclastos e reduzem a remodelação óssea através de diferentes mecanismos farmacológicos (7). Apesar disso, os casos de MRONJ se apresentam de forma semelhante clinicamente (8).

O diagnóstico de MRONJ é baseado em aspectos clínicos e na presença de osso exposto ou que possa ser sondado na região maxilomandibular, e a detecção precoce do risco de desenvolvimento de osteonecrose antes da exposição óssea ainda é um desafio. Recentemente, têm sido discutidos aspectos clínicos e imaginológicos iniciais da doença e a possibilidade de ocorrência MRONJ sem exposição óssea intraoral (9, 10).

Os achados imaginológicos relacionados à MRONJ podem incluir esclerose óssea, alterações osteolíticas, sequestros ósseos, reações periosteais e perfurações corticais (11, 12). Embora esses achados não façam parte dos critérios principais de diagnóstico e sejam inespecíficos, os exames por imagem são capazes de comprovar a validade das informações do exame clínico referentes ao curso, à magnitude e à progressão da doença.

Diversos estudos têm sido realizados em humanos e animais sobre a MRONJ. Diversos modelos animais já utilizaram a extração de dentes e a administração de medicamentos em altas doses para reproduzir os achados clínicos e de imagem de osteonecrose em humanos. No entanto, a fisiopatologia da doença permanece incerta (13), e ainda não está claro na literatura quais são os sinais precoces e as diferenças entre a osteonecrose causada por diferentes medicamentos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DEFINIÇÃO

A osteonecrose por uso de medicamentos é uma doença rara que afeta gravemente o osso maxilomandibular, causando lesões com alta morbidade e grande dificuldade de tratamento. Esta condição foi primeiramente relatada por Marx, em 2003 (2) e nomeada como osteonecrose por uso de bisfosfonatos (BRONJ). Posteriormente, foi observado um crescente número de casos associados a outros medicamentos antirreabsortivos e antiangiogênicos, como o relato da osteonecrose por uso de denosumabe (DRONJ) (3). Em 2014, a Associação Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais recomendou a mudança da nomenclatura para osteonecrose por uso de medicamentos e definiu a condição a partir da presença das seguintes características clínicas: tratamento prévio ou atual com agentes antirreabsortivos ou antiangiogênicos, presença de osso exposto ou osso que possa ser sondado através de fístula intraoral ou extraoral por mais de oito semanas e ausência de histórico de radioterapia maxilomandibular ou de doença metastática maxilomandibular (1). Recentemente, a inclusão da variante da MRONJ com ausência de exposição óssea tem sido discutida (14).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

A prevalência e a incidência da MRONJ variam em função da doença inicial, do tipo de medicação utilizada, do tempo de uso e da via de administração. Os pacientes com doenças malignas e metástases óssea em uso de antirreabsortivos em altas doses, principalmente ácido zoledrônico (ZA) ou DMAb, sofrem mais frequentemente com a MRONJ. Pacientes com osteoporose que recebem medicamentos antirreabsortivos orais estão em menor risco de desenvolver a doença.

A prevalência da MRONJ relacionada ao uso de BFs orais, geralmente indicados para o tratamento de osteoporose, é baixa, relatada entre 0% a 0,04% (15). Em pacientes oncológicos em tratamento com BFs intravenosos, a taxa de prevalência varia de 0% a 0,186% (15). Em pacientes em tratamento de osteoporose,

os BFs orais são relacionados à incidência de osteonecrose de 1,04 a 69 por 100.000 pacientes-ano, e a incidência com o uso de DMAb varia de 0 a 30,2 por 100.000 pacientes-ano (15). Em pacientes com doenças malignas em tratamento intravenoso com BFs, a incidência de BRONJ varia de 0 a 12.222 por 100.000 pacientes-ano, e a incidência de DRONJ em pacientes recebendo DMAb por via subcutânea varia de 0 a 2.316 por 100.000 pacientes-ano (15).

Há evidências de que o DMAb acarreta maior incidência de MRONJ do que BFs em pacientes em tratamento oncológico (16, 17). A revisão sistemática de Srisvastava e colaboradores sugeriu ainda um aumento da prevalência de MRONJ associado à terapia sequencial com drogas antirreabsortivas com a administração de pamidronato-zoledronato e de bifosfonato-denosumabe em comparação com a terapia com medicamento único (18).

2.3 MEDICAMENTOS

A MRONJ é decorrente da toxicidade de drogas, e os mecanismos de ação e de pelos quais esta condição é desenvolvida diferem entre os diversos antirreabsortivos e antiangiogênicos. Os principais medicamentos relacionados ao desenvolvimento da MRONJ são os BFs e o DMAb, cujos seus efeitos envolvem a redução da atividade osteoclástica e, conseqüentemente, a redução da remodelação óssea.

Os BFs são análogos sintéticos dos pirofosfatos endógenos e classificados como não nitrogenados ou nitrogenados. Devido à maior eficácia e pobre degradação metabólica das formas nitrogenadas, elas são mais frequentemente associadas com à BRONJ (19, 20). O ácido zoledrônico é um exemplo de bifosfonato nitrogenado que geralmente é administrado por via intravenosa em pacientes com metástase óssea (19, 20). Esse possui alta afinidade pela hidroxiapatita na matriz óssea e permanece depositado no tecido ósseo. Quando os osteoclastos aderem à superfície óssea para iniciar a reabsorção, enzimas são liberadas, acidificam o ambiente e promovem a degradação óssea. Os detritos ósseos carregados com BFs são fagocitados pelos osteoclastos e, uma vez dentro dos osteoclastos, os BFs reduzem a atividade celular ou induzem apoptose (7).

O DMAb é um anticorpo monoclonal humano que apresenta efeitos antirreabsortivos e imita a osteoprotegerina ao se ligar ao ativador do receptor do fator nuclear kappa B (RANKL) e inibi-lo. RANKL é uma citocina produzida e liberada pelos osteoblastos para induzir a diferenciação dos pré-osteoclastos em sua forma ativa. Ela se liga ao RANK, um receptor que é membro da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) e expresso na superfície de pré-osteoclastos. Portanto, o DMAb interfere na reabsorção óssea inibindo a diferenciação, a ativação e a sobrevivência de osteoclastos (7, 21). Diferentemente dos BFs, o DMAb não é conhecido por induzir apoptose nem por ter afinidade pela hidroxiapatita, não se fixando ao tecido ósseo (7, 22, 23). Além disso, o DMAb tem meia-vida mais curta, o que sugere que seus efeitos sejam reversíveis (24).

2.4 FATORES DE RISCO

A patogênese da MRONJ não é bem conhecida. Apesar do efeito dos medicamentos ser sistêmico, o desenvolvimento das lesões ocorre no osso maxilomandibular provavelmente devido às características únicas desta região, como a presença de dentes e de uma microbiota diversificada.

Os tratamentos odontológicos invasivos, como cirurgias orais, são fatores de risco relacionados com a MRONJ, bem como as doenças periodontais e periapicais. A extração dentária é um dos principais fatores associados ao desenvolvimento da MRONJ (25). Estudos recentes, contudo, tem questionado se o fator para aumento do risco de desenvolver MRONJ é de fato a extração do dente ou é a doença preexistente nos dentes extraídos. A presença de doença dentária inflamatória prévia à extração dentária foi apresentada como um fator chave para o desenvolvimento da MRONJ em pacientes em uso de altas doses de BFs e DMAb por Soutome e colaboradores (26). Esses autores sugeriram que a infecção subjacente e não a extração coloque o paciente em risco aumentado de MRONJ. Em modelo animal com uso de antireabsortivos em altas doses, a extração de dentes doentes, mas não de dentes saudáveis, levou a defeitos da mucosa e características radiográficas e histológicas de MRONJ, sugerindo que a doença dentária é crítica na patogênese como um fator agravante no desenvolvimento da MRONJ (27). Além disso, foi observado em modelo animal que os BFs dificultam a reabsorção necessária do osso que se tornou alterado

devido à infecção após extração dentária, sugerindo que o sequestro de osso necrótico ou infectado é uma importante etapa do processo de cicatrização e fortalecendo ainda a hipótese de que a reabsorção inibida pode desempenhar um papel chave na patogenia da MRONJ (28).

A redução do risco de ocorrência da MRONJ foi observada quando o tratamento odontológico preventivo foi implementado, mesmo com o aumento da exposição aos medicamentos (29). Os resultados obtidos por Ueda e colaboradores, ao avaliarem a relação entre doença inflamatória dentária e risco de desenvolvimento de MRONJ, sugeriram que a extração profilática de dentes com alterações radiopacas no osso ao redor da raiz antes de iniciar a terapia com antirreabsortivos pode prevenir o aparecimento de MRONJ (30).

Estes estudos sugerem a existência de três aspectos importantes na patogênese da MRONJ: o uso de medicamentos, o trauma ou a infecção local e a resposta óssea local. Entretanto, apesar de já terem sido identificados diversos potenciais fatores de risco para MRONJ, mais informações são necessárias para guiar a identificação e o manejo dos pacientes em risco (31).

2.5 ESTADIAMENTO

A apresentação clínica e em exames de imagem da MRONJ difere de acordo com o curso da doença. Com o início da exposição à terapia medicamentosa e o efeito no processo de remodelação óssea, o paciente pode estar em risco de desenvolver alterações ósseas patológicas. Para adequada categorização, foram propostos diversos sistemas de estadiamento da MRONJ, abrangendo desde as primeiras alterações não específicas possivelmente relacionadas ao desenvolvimento da osteonecrose até graves condições com complicações relacionadas a fraturas ósseas e infecções. Em seu artigo de posicionamento atualizado em 2014 (1), a Associação Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais apresentou os estágios de 0-3 da MRONJ (Quadro 1).

A detecção precoce da MRONJ e a capacidade de prever as áreas em risco de desenvolvimento de lesões necróticas podem oferecer importantes dados para o efetivo manejo dos pacientes. Quando a lesão clínica é visível, o tratamento pode ser complicado, e o prognóstico, duvidoso. Por isso, os primeiros sinais e sintomas

relacionados ao desenvolvimento da doença têm sido pesquisados com o objetivo de identificar e reconhecer os pacientes com maior risco, evitar a evolução e a complicação do quadro clínico.

Estudos recentes sugerem a presença de sinais e sintomas da MRONJ na ausência de exposição óssea e apresentam a variante não exposta da osteonecrose, salientando a importância desta variante estar incluída na definição da doença (32). Dor maxilomandibular, aumento ósseo, aumento gengival, fístula e anormalidades radiográficas são achados observados em pacientes expostos a BFs, mas sem lesão evidente (10). Ainda não está claro, entretanto, o prognóstico associado aos sinais e sintomas iniciais e da variante não exposta da MRONJ. Não há evidências suficientes que permitam afirmar se haverá ou não o desenvolvimento da lesão exposta em momento posterior, e a exata importância dos fatores de risco desencadeantes no curso da doença. Também não foi claramente evidenciado se existem diferenças em alterações precoces entre a condição causada por diferentes medicamentos.

Quadro 1 – Estadiamento da MRONJ	
Estágio	Características
Em risco	Ausência de osso necrótico aparente em pacientes que foram tratados com bisfosfonatos orais ou intravenosos
Estágio 0	Nenhuma evidência clínica de osso necrótico, mas há achados clínicos inespecíficos, alterações radiográficas e sintomas
Estágio 1	Osso exposto e necrótico ou fístulas que penetram o osso em pacientes que são assintomáticos e não têm evidência de infecção
Estágio 2	Osso exposto e necrótico ou fístulas que penetram o osso associados à infecção, evidenciada por dor e eritema na região do osso exposto com ou sem drenagem purulenta
Estágio 3	Osso exposto e necrótico ou fístula que penetra o osso em pacientes com dor, infecção e um ou mais dos seguintes sinais e sintomas: osso exposto e necrótico que se estende além da região do osso alveolar (ou seja, borda inferior e ramo na mandíbula, seio maxilar e zigoma na maxila) resultando em fratura patológica, fístula extraoral, comunicação oroantral ou oronasal, ou osteólise se estendendo até a borda inferior da mandíbula ou assoalho do seio nasal

Fonte: Ruggiero e colaboradores (1)

2.6 EXAMES DE IMAGEM

Ainda que não façam parte dos critérios de diagnóstico e estadiamento da MRONJ, os achados em exames de imagem podem ajudar na identificação de alterações ósseas relevantes. Radiografia panorâmica, radiografia periapical, tomografia computadorizada e cintilografia são exames capazes de auxiliar na identificação dos sinais e da extensão da doença, na escolha da terapia e no monitoramento das respostas ao tratamento. A tomografia computadorizada (TC) é o método de imagem mais sensível para avaliar alterações ósseas, proporcionando excelente resolução de imagem. A tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) pode permitir a detecção da lesão em um estágio precoce, ajudando a monitorar melhor o progresso da doença, e mostrar mais diferenças nos parâmetros ósseos entre distintas apresentações da osteonecrose quando comparada com radiografia panorâmica (33).

Os achados imaginológicos relacionados à MRONJ são diversos. As características específicas em exames de imagem relacionadas ao uso de medicamentos antirreabsortivos e antiangiogênicos, e ao consequente desenvolvimento de MRONJ, têm sido estudadas, investigando as alterações precoces, as diferenças relacionadas aos estágios da doença e aos medicamentos utilizados. Entretanto, as imagens são inespecíficas e se assemelham às encontradas em outras condições patológicas, como a osteorradionecrose, a osteomielite comum e a metástase óssea (34).

Algumas alterações radiográficas precoces já foram associadas ao uso de antirreabsortivos, como esclerose óssea, áreas osteolíticas, espessamento da lâmina dura, alvéolo visível e persistente após extração, radiolucidez periapical (sem ou com osteíte adjacente), córtex mandibular mais espesso, alargamento do espaço do ligamento periodontal, perda óssea periodontal e realce do canal da mandíbula (35). Em pacientes em estágio 0, Moreno-Rabié e colaboradores observaram também estreitamento do canal da mandíbula, alterações no padrão trabecular, sequestro ósseo, ruptura cortical, defeito em cratera e reação periosteal (35). A relação da densidade alveolar com a MRONJ também tem sido investigada. Foi verificado que a medição da densidade do osso trabecular realizadas em TC pode ser considerada como um método potencial para detectar os estágios iniciais do MRONJ (36). Um estudo recente observou que os valores de TC para osso trabecular em ambas as

áreas afetadas e não afetadas de pacientes com MRONJ foram significativamente superiores aos do grupo saudável (37).

Quanto aos diferentes medicamentos, é possível que a DRONJ apresente características imaginológicas diferentes da BRONJ devido às diferenças nos efeitos das drogas. Contudo, não estão claras se existem e quais seriam as principais diferenças. Baba e colaboradores mostraram que a MRONJ tem achados de imagem tomográficos que podem ser úteis para sua avaliação e, comparando os medicamentos, encontraram que a DRONJ mostrou sequestro maior e reação periosteal com maior frequência do que a BRONJ (11). Por outro lado, sequestro ósseo e destruição do osso cortical pareceram ser significativamente menos comuns no grupo do DMAb do que no grupo dos BFs no estudo de Pichardo e colaboradores (38).

Em modelos animais, a microtomografia computadorizada (microTC) tem sido utilizada para avaliar as alterações ósseas associadas à MRONJ, pois permite avaliar a morfologia e a microarquitetura ósseas em roedores e outros pequenos animais com alta resolução. Diversos modelos animais de BRONJ já foram propostos utilizando altas doses de BFs e extrações dentárias para reproduzir os achados clínicos e imaginológicos da MRONJ em humanos. Aumento da massa óssea e da densidade mineral óssea, reação periosteal, comprometimento da cicatrização e atraso na formação óssea após extração foram alterações observadas em modelos animais de BRONJ (39). A pesquisa da DRONJ em modelo animal é mais desafiadora, já que o DMAb não reconhece o RANKL de roedores devido às diferenças sequenciais e estruturais entre RANKL humano e animal. Novos modelos animais têm sido propostos (27), e as imagens de microTC tem contribuído no estudo da MRONJ.

3 HIPÓTESES

3.1 As alterações relacionadas à osteonecrose no osso mandibular podem ocorrer precocemente após o uso de medicamentos antirreabsortivos.

3.2 As lesões relacionadas à osteonecrose causada por diferentes medicamentos apresentam características clínicas e imaginológicas distintas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar alterações clínicas e imaginológicas associadas à osteonecrose por uso de medicamentos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Avaliar as alterações clínicas e imaginológicas precoces no osso mandibular em modelo animal de osteonecrose por uso de medicamentos;

4.2.2 Revisar sistematicamente a literatura disponível sobre os aspectos clínicos e imaginológicos da osteonecrose por uso de medicamentos, comparando bisfosfonatos e denosumabe.

5 METODOLOGIA DO ESTUDO EXPERIMENTAL

5.1 ANIMAIS

A amostra inicial foi composta por quarenta ratas (*Rattus norvegicus*). Os animais foram selecionados aleatoriamente, divididos em grupos de quatro e alojados em gaiolas de polipropileno, com temperatura média de $23^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C e ciclo claro/escuro de 12h. Água e comida foram fornecidas livremente, ad libitum. Após 2 semanas de aclimação, as ratas foram divididas aleatoriamente em dois grupos: ácido zoledrônico (ZA) e controle. Eles foram anestesiados e sedados (cetamina 10%, 90 mg/kg; xilazina 2%, 15 mg/kg) quando necessário para a realização dos experimentos.

5.2 ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAMENTO

Os animais do grupo ZA receberam o medicamento Zometa® 4 mg/5 ml (Novartis, Pharma, Basel, Suíça), na dose 66 µg/kg. O grupo controle recebeu solução salina em dosagem de volume semelhante, como placebo. Os ratos foram pesados antes de cada fase experimental para dosar adequadamente os medicamentos administrados, bem como para controlar o ganho ou perda de peso durante todo o estudo. A medicação foi administrada por injeção intraperitoneal, três vezes por semana, durante três semanas. Esse protocolo foi previamente testado em um estudo piloto. No momento da administração do ácido zoledrônico, a idade média dos ratos era de 8 semanas e o peso médio era 250 g.

5.3 EXTRAÇÃO DENTÁRIA

As extrações dentárias foram realizadas nos animais de ambos os grupos, ZA e controle, três semanas após o início da aplicação de medicamentos. Os primeiros molares inferiores esquerdos foram extraídos pelo mesmo operador em todos os animais dos dois grupos com um explorador dentário. Após a extração, os animais foram cuidadosamente assistidos, e um medicamento analgésico foi administrado

duas vezes ao dia, durante dois dias (tramadol, 60 mg/kg/dia). Os animais foram pesados duas vezes por semana durante as seis semanas seguintes. O comportamento, a capacidade de alimentação e a presença de lesões externas na boca região foram observados diariamente.

5.4 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA POR MICROTOMOGRAFIA

Os exames de microTC foram realizadas com o equipamento SkyScan 1076 (Bruker, Kontich, Bélgica), que permite a obtenção de imagens de animais vivos. Os parâmetros técnicos foram 18 μm de tamanho de pixel, 100 kV, 100 μA , filtro de Al 1,0 mm, etapa de rotação de 0,44, média de 5 quadros e 37 min de tempo médio de varredura. As reconstruções das imagens tridimensionais foram obtidas com artefato de anel, correção de suavização e endurecimento de feixe fixados na 14ª posição, nível um e 55%, respectivamente (software NRecon com aceleração de GPU, versão 1.6.9, Bruker, Kontich, Bélgica). Para obtenção das imagens, o posicionamento dos animais foi padronizado em decúbito ventral, com a cabeça apoiada e estabilizada (Figura 1). Durante todo o escaneamento, os animais foram acompanhados cuidadosamente por câmera de vídeo instalada dentro do equipamento de microTC.



Figura 1 Posicionamento dos animais no equipamento SkyScan em decúbito ventral para obtenção das imagens microtomográficas (A), imagem de microCT bidimensional utilizada para conferência do posicionamento do animal no equipamento e definição da região a ser examinada (B).

No total, o estudo compreendeu três etapas experimentais sequenciais de avaliação (Figura 2).

T0: O primeiro exame de microTC ocorreu no dia experimental 0, antes da medicação e das extrações dentárias, para analisar as alterações ósseas qualitativas e quantitativas basais.

T1: A segunda microTC foi realizada após três semanas de medicação para investigar alterações ósseas associadas à administração de ácido zoledrônico, antes das exodontias.

T2: As últimas imagens de microTC foram adquiridas seis semanas após as exodontias para avaliar as alterações ósseas associadas à osteonecrose dos maxilares.

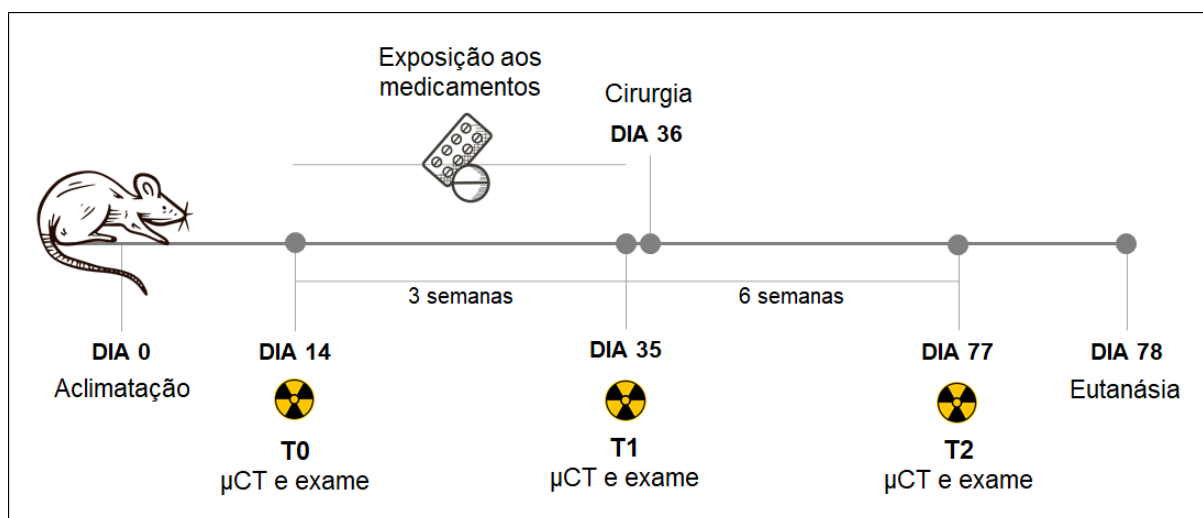


Figura 2 Protocolo experimental: aclimação por 14 dias, avaliação microtomográfica e clínica em três tempos (T0, T1 e T2), período de administração de ácido zoledrônico e placebo com duração de 3 semanas entre T0 e T1, cirurgia de extração de primeiros molares inferiores do lado esquerdo logo após T1, período de espera e observação com duração de 6 semanas entre T1 e T2.

Uma radiologista (NF) experiente analisou as imagens usando os softwares CTAn (versão 1.13, Bruker, Kontich, Bélgica) e um monitor de 24 pol. (UltraSharp™ U2410, Dell, Rio Grande do Sul, Brasil), em sala escura e com cegamento para identificação do grupo de animais. O lado esquerdo, no qual foram realizadas extrações dentárias nos dois grupos estudados, representou uma área com fator de indução para MRONJ no grupo ZA (área supostamente afetada). O lado direito representou uma área não exposta ao trauma mecânico (sem extração dentária)

denominada “área não afetada”. O lado direito foi avaliado para verificar os efeitos do ZA no osso não exposto ao fator de risco.

Para análise quantitativa do osso trabecular, um volume cilíndrico tridimensional de interesse (VOI) com diâmetro de seção de 561,2 μm e comprimento de 540 μm (30 camadas), localizado abaixo da raiz lingual média do primeiro molar, entre a cortical lingual e o canal mandibular, foi definido no osso trabecular para os lados direito e esquerdo da mandíbula (Figura 3).

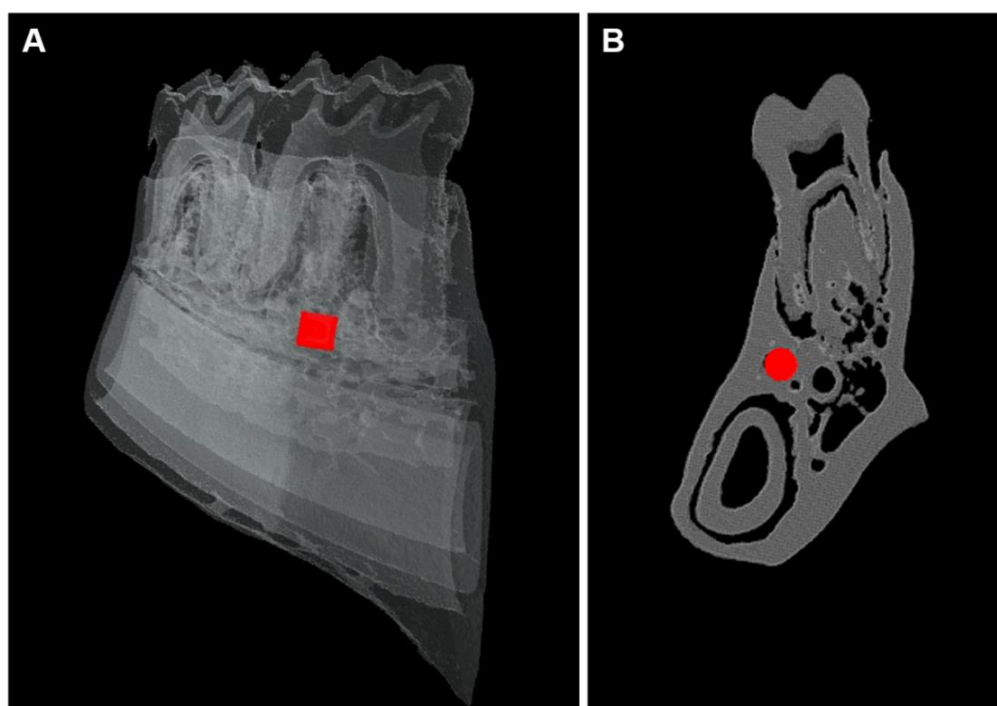


Figura 3 Reconstrução 3D ilustrando o Volume de Interesse (VOI) selecionado no osso mandibular. A – Vista lateral 3D mostrando o VOI selecionado. B – Imagem coronal do VOI.

Os seguintes parâmetros morfométricos do osso trabecular foram calculados no VOI selecionado em ambos os lados.

- Densidade mineral óssea: Este parâmetro é calculado a partir do valor médio de atenuação do tecido ósseo selecionado. Um padrão de calibração é necessário para relacionar os valores tomográficos a um valor mineral equivalente, normalmente em miligramas por centímetro cúbico (mg/cm^3). Neste processo de calibração, o conjunto de dados de tons de cinza foi transformado em unidades Hounsfield (HU), e os valores HU obtidos pelo exame microtomográfico de dois padrões de hidroxiapatita de cálcio (0,25 e

0,75 gHA /cm³) foram usados para calibrar as escalas de densidade contra unidades HU.

- Espessura óssea trabecular (Tb.Th, μm): É uma medida da largura média da estrutura óssea.
- Fração de volume ósseo (VB / TV): É uma medida da quantidade óssea, representada pela proporção do VOI selecionado ocupado por trabéculas (%).

5.5 AVALIAÇÃO QUALITATIVA POR MICROTOMOGRÁFIA

A existência de destruição do osso cortical, de reação periosteal e de sequestro ósseo nos exames microtomográficos também foi avaliada nas três fases experimentais, T0, T1 e T2. Para esta avaliação qualitativa, toda a região mandibular foi examinada nos cortes tomográficos coronal, sagital e axial pelo mesmo examinador em busca das alterações visuais utilizando o software Dataviewer (versão 1.5.0, Bruker, Kontich, Bélgica).

5.6 AVALIAÇÃO CLÍNICA

As análises clínicas foram realizadas por um único examinador em sala iluminada para determinar visualmente a presença de exposição óssea, de abscessos ou de fístulas nas três fases do experimento, T0, T1 e T2. A avaliação visual teve como objetivo verificar o início do desenvolvimento da lesão intraoral da MRONJ após a extração dentária.

Todos os animais do estudo foram eutanasiados após a fase experimental de T2 com exposição ao CO₂.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA). Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. A análise descritiva foi apresentada para os dados dos

parâmetros microTC com base nos grupos, na fase de avaliação e no lado da mandíbula. Uma vez que um experimento foi realizado em um campo de estudo completamente aleatório, os dados foram avaliados por meio de testes paramétricos. A análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas foi utilizada para comparar as variáveis quantitativas, seguida do teste de Fisher (LSD) em caso de significância estatística. O teste qui-quadrado foi usado para comparar as variáveis qualitativas entre os grupos ZA e controle.

6 RESULTADOS DO ESTUDO EXPERIMENTAL

6.1 AMOSTRA

A amostra inicial foi composta por 40 ratas. No entanto, quatro animais foram excluídos do estudo devido a artefatos de movimento nos exames de microTC. Dois animais foram excluídos devido à extração acidental do segundo molar durante o procedimento cirúrgico. Quatro animais morreram após os procedimentos de anestesia e sedação. Portanto, a amostra final foi composta por 30 animais, sendo 13 ratas do grupo controle e 17 do grupo tratado com ZA. O peso, o comportamento e a capacidade de alimentação não diferiram significativamente entre os animais dos dois grupos durante todo o experimento.

6.2 COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS ESTRUTURAIS DO OSSO NO LADO DIREITO (ÁREA NÃO AFETADA) ENTRE O GRUPO ZA E O GRUPO CONTROLE

A Tabela 1 apresenta a comparação dos valores médios dos parâmetros estruturais do osso trabecular do lado direito entre o grupo ZA (área não afetada) e o grupo controle. Em ambos os grupos ZA e controle, os valores médios de BMD foram maiores em T2 / T1 do que em T0. Embora tenha havido tendência de maiores valores de BMD no grupo ZA, não foram encontradas diferenças significativas entre os valores médios de BMD do lado direito entre os grupos ZA e controle para cada fase experimental (T0, T1 e T2). Tb.Th aumentou de T0 para T1 no grupo ZA, mas não foi diferente ao longo das três fases experimentais no grupo controle. Depois da extração dentária (T2), Tb.Th foi significativamente maior no grupo ZA do que no grupo controle. BV/TV aumentou de T0 para T1 em ambos os grupos ZA e controle. No entanto, em T2 esse parâmetro ósseo foi significativamente maior no grupo ZA.

6.3 COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS ESTRUTURAIS DO OSSO NO LADO ESQUERDO (SUPOSTA ÁREA AFETADA) ENTRE O GRUPO ZA E O GRUPO CONTROLE

A Tabela 2 apresenta a comparação dos valores médios dos parâmetros estruturais do osso trabecular na suposta área afetada entre o grupo ZA e o grupo controle. Os valores médios de BMD aumentaram ao longo das três fases experimentais em ambos os grupos ZA e controle. No lado esquerdo, embora o grupo ZA tenha apresentado valores de BMD maiores que o grupo controle, as diferenças não foram estatisticamente significativas. Tb.Th aumentou de T0 para T1 no grupo ZA, mas não foi diferente ao longo das três fases experimentais no grupo controle. Após a extração dentária (T2), Tb.Th foi significativamente maior no grupo ZA do que no grupo controle. BV/TV aumentou em todas as três fases em ambos os grupos ZA e controle. No entanto, em T2 esse parâmetro ósseo foi significativamente maior no grupo ZA do que no grupo controle.

6.4 COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS ESTRUTURAIS DO OSSO NO LADO ESQUERDO E DIREITO DA MANDÍBULA DOS GRUPOS ZA E CONTROLE

No grupo controle, os valores médios de BMD foram maiores no lado da extração do dente do que no lado direito. No grupo ZA, a suposta área afetada (lado da exodontia) também apresentou valores médios de BMD significativamente maiores do que o lado direito. Apenas em T2, os valores médios de Tb.Th do lado esquerdo foram significativamente maiores do que do lado direito em ambos os grupos ZA e controle. No lado da extração dentária, em T2, os valores médios de BV/TV foram significativamente maiores do que no lado direito nos grupos ZA e controle. Quando a interação de todas as variáveis estudadas (diferentes fases experimentais, grupo estudado e lados mandibulares) foram avaliadas em conjunto, não foram encontradas diferenças ($p > 0,05$). Por outro lado, quando as variáveis foram analisadas separadamente, houve diferenças significativas na comparação dos valores médios dos parâmetros ósseos microtomográficos entre os lados direito e esquerdo, entre os dois grupos (ZA e o grupo controle) e entre os três pontos no tempo (Figura 4).

6.5 AVALIAÇÃO QUALITATIVA POR MICROTOMOGRÁFIA

As características microtomográficas visuais também só foram detectadas após as extrações dentárias (T2). A frequência de destruição do osso cortical foi significativamente maior no grupo ZA (41%, 7 animais) do que no grupo de controle (8%, 1 animal), $p = 0,04$. A reação periosteal foi observada apenas no grupo ZA (35%, 6 animais). Um animal do grupo ZA (6%) teve sequestro ósseo na área afetada de MRONJ. Treze animais do grupo ZA (76%) apresentaram exposição óssea. Um exemplo de lesão óssea do lado esquerdo de um animal do grupo ácido zoledrônico, com intensa reação periosteal é mostrado na Figura 5.

6.5 AVALIAÇÃO CLÍNICA

As características clínicas da MRONJ nos animais estudados só foram detectadas na última fase do experimento (T2), após as exodontias (Figura 6). Nenhum dos animais do grupo controle apresentou exposição óssea ou outros sinais clínicos característicos associados ao MRONJ. Por outro lado, 14 (78%) dos animais do grupo ZA apresentaram esse quadro clínico característico do MRONJ ($p < 0,001$, qui-quadrado). Abscessos ou fístulas também foram encontrados apenas no grupo experimental, em 3 animais (18%, $p = 0,110$, qui-quadrado).

Tabela 1 – Comparação dos parâmetros do osso trabecular no lado direito (área não afetada) entre o grupo ZA e o grupo controle

	Ácido zoledrônico						Controle					
	T0		T1		T2		T0		T1		T2	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
BMD	0.403 ^{aA}	0.074	0.546 ^{bA}	0.064	0.603 ^{bA}	0.083	0.332 ^{aA}	0.116	0.440 ^{bA}	0.142	0.492 ^{bA}	0.130
Tb.Th	89.455 ^{aA}	17.341	130.901 ^{bA}	22.850	150.029 ^{bA}	24.513	84.387 ^{aA}	20.169	113.438 ^{aA}	28.131	108.322 ^{aB}	22.953
BV/TV	27.464 ^{aA}	8.693	46.113 ^{bA}	8.561	53.007 ^{bA}	9.552	22.270 ^{aA}	12.492	34.180 ^{bA}	17.516	38.079 ^{bB}	15.244

BMD – Densidade mineral óssea, Tb.Th – Espessura trabecular, BV/TV – Fração de volume ósseo, T0 – avaliação microTC inicial, T1 – avaliação microTC após administração de drogas e antes da extração dentária, T2 – avaliação microTC após extração dentária

^{a, b, c} Comparações dentro do grupo (linha): as médias seguidas pela mesma letra minúscula não são significativamente diferentes para os animais do grupo ácido zoledrônico ou do grupo controle ($p > 0,05$).

^{A, B, C} Comparações entre grupos (linha): as médias seguidas da mesma letra maiúscula não são significativamente diferentes entre os grupos ácido zoledrônico e controle ($p > 0,05$).

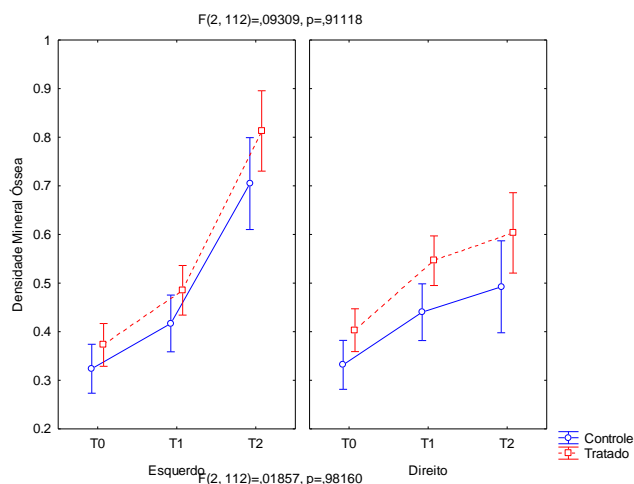
Tabela 2 – Comparação dos parâmetros do osso trabecular no lado esquerdo (área afetada) entre o grupo ZA e o grupo controle

	Ácido zoledrônico						Controle					
	T0		T1		T2		T0		T1		T2	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
BMD	0.373 ^{aA}	0.076	0.485 ^{bA}	0.085	0.813 ^{cA}	0.184	0.324 ^{aA}	0.099	0.417 ^{bA}	0.128	0.705 ^{cA}	0.253
Tb.Th	81.102 ^{aA}	14.507	117.474 ^{bA}	23.349	218.191 ^{cA}	82.526	77.245 ^{aA}	18.223	101.358 ^{aA}	26.567	176.078 ^{bB}	79.575
BV/TV	25.069 ^{aA}	10.461	38.958 ^{bA}	11.089	75.967 ^{cA}	19.336	20.467 ^{aA}	11.564	32.533 ^{bA}	13.723	61.951 ^{cB}	27.330

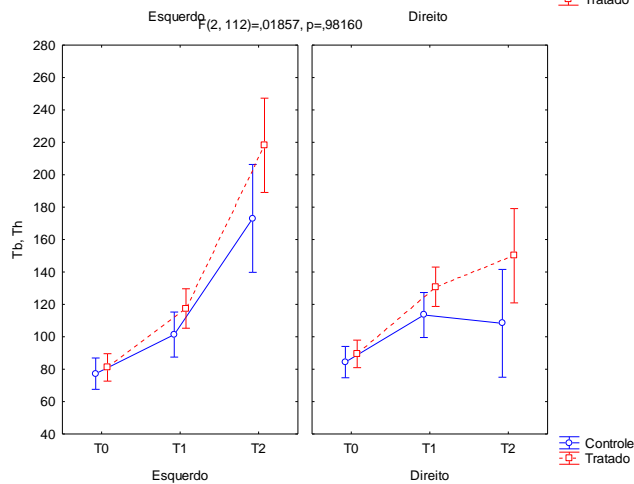
BMD – Densidade mineral óssea, Tb.Th – Espessura trabecular, BV/TV – Fração de volume ósseo, T0 – avaliação microTC inicial, T1 – avaliação microTC após administração de drogas e antes da extração dentária, T2 – avaliação microTC após extração dentária

^{a, b, c} Comparações dentro do grupo (linha): as médias seguidas pela mesma letra minúscula não são significativamente diferentes para os animais do grupo ácido zoledrônico ou do grupo controle ($p > 0,05$).

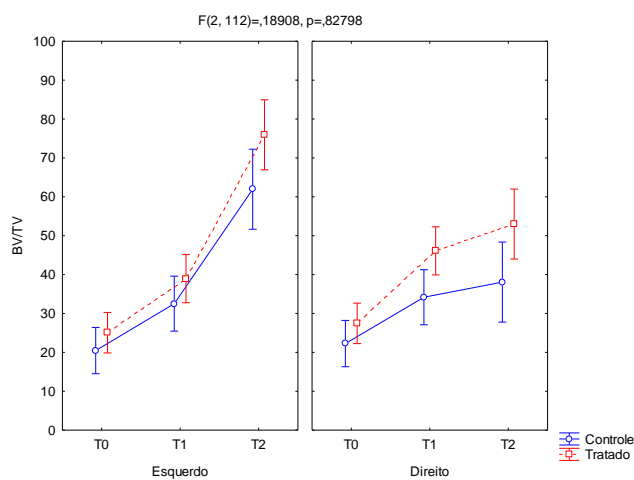
^{A, B, C} Comparações entre grupos (linha): as médias seguidas da mesma letra maiúscula não são significativamente diferentes entre os grupos ácido zoledrônico e controle ($p > 0,05$).



Comparação entre os lados direito e esquerdo $p=0,036$
 Comparação entre os grupos ZA e controle $p<0,001$
 Comparação entre os três tempos experimentais $p<0,001$



Comparação entre os lados direito e esquerdo $p=0,014$
 Comparação entre os grupos ZA e controle $p<0,001$
 Comparação entre os três tempos experimentais $p<0,001$



Comparação entre os lados direito e esquerdo $p=0,042$
 Comparação entre os grupos ZA e controle $p<0,001$
 Comparação entre os três tempos experimentais $p<0,001$

Figura 4 Comparação dos valores médios e intervalos de confiança de todos os parâmetros ósseos microtomográficos quantitativos: Densidade Mineral Óssea – BMD (A), Espessura Trabecular – Tb.Th (B) e Fração de Volume Ósseo – BV/TV (C). Todos esses parâmetros ósseos já estavam alterados após a administração de zolendronato e antes do trauma local (T2).

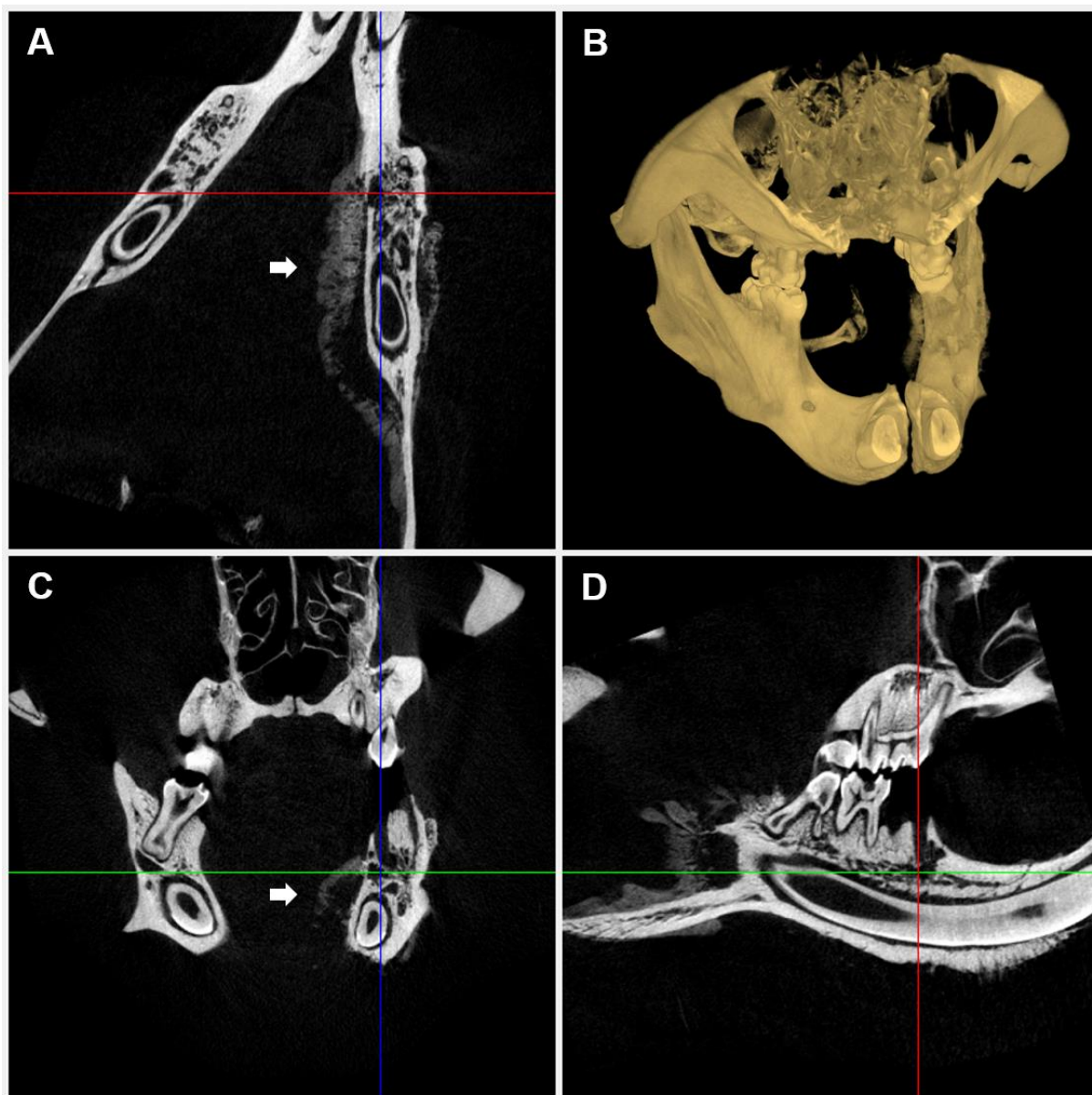


Figura 5 Imagens de reconstrução multiplanar (A, C e D) e imagem tridimensional (B) de microTC mostrando lesões osteolíticas e reação periosteal em um animal do grupo ácido zoledrônico (setas brancas). A – imagem axial. B – vista frontal 3D. C – imagem coronal. D - imagem sagital.

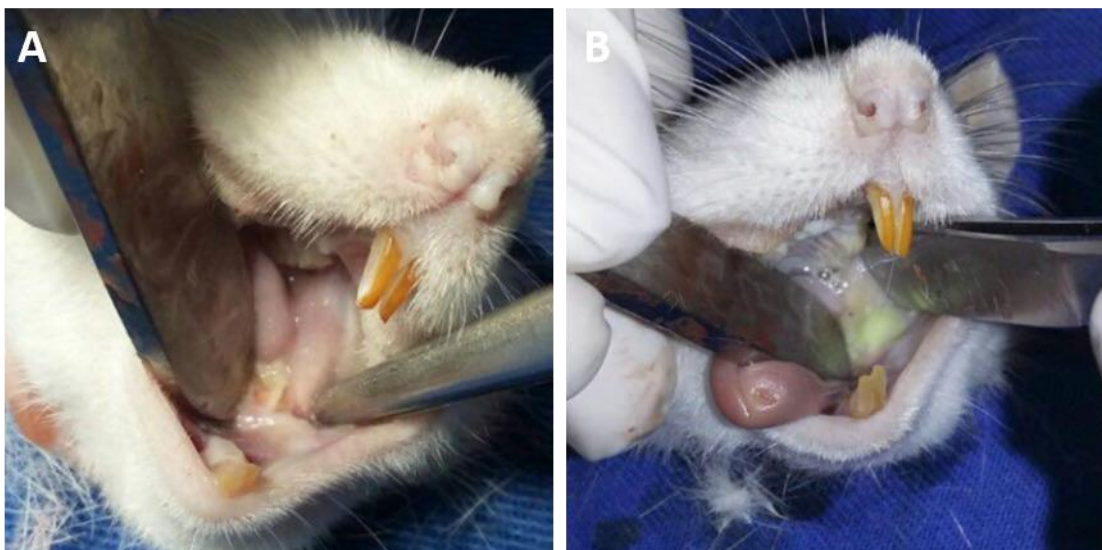


Figura 6 Fotografias clínicas mostrando exposição óssea (A) e abscesso (B) em animais do grupo ácido zoledrônico.

7 METODOLOGIA DA REVISÃO SISTEMÁTICA

7.1 PROTOCOLO

O protocolo desenvolvido e aprovado para esta revisão sistemática foi submetido ao Open Science Framework (OSF), registro DOI 10.17605/OSF.IO/SFVP8, em 7 de agosto de 2020. Esta revisão sistemática foi desenvolvida de acordo com o Manual para revisões do Instituto Joanna Briggs e relatada de acordo com os itens do PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*) (40, 41).

7.2 PERGUNTA

Esta revisão foi delineada e executada para responder à seguinte pergunta: a osteonecrose por uso de bisfosfonatos e a osteonecrose por uso de denosumabe são diferentes em relação aos aspectos clínicos e imaginológicos? Essa foi baseada na determinação da população, da exposição e do resultado de interesse. Pacientes com osteonecrose por uso de medicamentos compuseram a população. A exposição de interesse foi o tratamento com bisfosfonatos ou denosumabe, e o resultado buscado foi a comparação de características clínicas e imaginológicas da BRONJ e da DRONJ.

7.3 CRITÉRIOS DE ELEIÇÃO

Nesta revisão sistemática, foram incluídos estudos observacionais e clínicos nos quais pacientes adultos com osteonecrose por uso de BF e DMAb foram avaliados e os achados clínicos e imaginológicos foram comparados. Os critérios de exclusão compreenderam: (1) revisões, cartas, diretrizes, opiniões pessoais, capítulos de livros, painéis, editoriais, resumos de conferências, relatos de casos e séries de casos; (2) estudos que não relataram nenhuma característica clínica ou imaginológica de MRONJ; (3) estudos *in vitro* e *in vivo*; (4) estudos que não relataram características de BRONJ e DRONJ; (5) estudos que não relataram o desenvolvimento de MRONJ após a terapia com BFs ou DMAb; (6) estudos nos quais a BRONJ e a DRONJ não foram

diferenciadas; (7) estudos sem informações; (8) estudos sem texto completo disponível; (9) e estudos escritos em alfabeto não latino.

7.4 FONTE DE INFORMAÇÃO E BUSCA NA LITERATURA

As buscas foram realizadas nas seguintes bases de dados: PubMed, Cochrane, Scopus, Web of Science e Lilacs. A estratégia completa para cada base de dados é apresentada no apêndice 1. ProQuest, Open Gray e Google Scholar foram acessados para busca na literatura cinzenta. Todos os bancos de dados foram pesquisados em 18 de março de 2019 e atualizados em 20 de janeiro de 2020.

7.5 SELEÇÃO DE ESTUDOS

Na primeira fase de seleção dos estudos, dois revisores avaliaram os títulos e os resumos das referências buscadas. Um terceiro revisor foi envolvido em caso de discordância sobre a seleção. Todos os estudos que não atenderam aos critérios de seleção foram identificados e excluídos. Na segunda fase de seleção, os textos completos dos artigos selecionados na primeira fase foram avaliados pelos mesmos dois revisores, e os mesmos critérios de inclusão e exclusão foram aplicados. O terceiro revisor foi envolvido sempre que necessário. Os artigos excluídos e as respectivas justificativas são apresentados no apêndice 2.

7.6 COLETA DE DADOS

Os dados sobre autores, ano de publicação, país, tipo de estudo, objetivo, amostra, intervenção, conclusão e desfechos foram coletados dos artigos incluídos. As comparações das características da BRONJ e da DRONJ foram o resultado de interesse e abrangeram aspectos clínicos como estadiamento, aparência, extensão e localização, e aspectos imaginológicos, como presença ou ausência de sequestro ósseo, extensão do sequestro ósseo e reação periosteal. Um revisor coletou todas as informações necessárias dos artigos selecionados. Um segundo revisor verificou as

informações coletadas. Quaisquer discordâncias foram discutidas entre os autores, e outros revisores foram envolvidos na decisão final sempre que necessário.

7.7 RISCO DE VIÉS

O risco de viés de estudos individuais foi avaliado com a ferramenta MASTARI (*Meta-Analysis of Statistics Assessment and Review Instrument*). O questionário de avaliação foi aplicado a cada estudo incluído individualmente. O risco de viés foi considerado alto se os itens classificados como "sim" representassem até 49% do total de itens, moderado se os itens classificados como "sim" estivessem entre 50 e 69% e baixo se os itens classificados como "sim" somassem mais de 70%. A avaliação de risco de viés está resumida no apêndice 3.

7.8 SÍNTESE DE RESULTADOS

A síntese descritiva dos dados foi realizada. Considerando a natureza heterogênea dos resultados esperados e os objetivos desta revisão sistemática, uma síntese quantitativa ou meta-análise não foi possível de ser realizada.

8 RESULTADOS DA REVISÃO SISTEMÁTICA

8.1 SELEÇÃO DE ESTUDOS

A busca nas bases de dados resultou em 7535 estudos. Depois da remoção de estudos duplicados, 5225 artigos permaneceram. Na fase 1, os títulos e os resumos foram analisados e 61 artigos foram incluídos na fase 2. Um estudo foi incluído a partir das bases de dados da literatura cinzenta. Após a leitura dos 62 artigos na íntegra, 55 não atenderam aos critérios de seleção e foram excluídos na segunda fase. Ao final, sete artigos atenderam aos critérios de inclusão e foram considerados para esta revisão. O fluxograma da Figura 7 ilustra o processo de identificação e seleção aqui descrito (42).

8.2 CARACTERÍSTICAS DO ESTUDO

Os sete estudos incluídos foram publicados entre 2011 e 2019 e conduzidos nos seguintes países: EUA (8), Canadá (43), Japão (11, 44), Alemanha (45, 46) e Holanda (38). O número total de pacientes foi de 7.755 (3.925 em tratamento com BFs, 3.722 com DMAb e 68 com os dois medicamentos), conforme observado na Tabela 3.

Matsui e colaboradores avaliaram 106 pacientes com metástases ósseas, osteoporose, reumatismo e outras doenças que estavam em tratamento com medicamentos antirreabsortivos (44). Eles foram divididos em dois grupos: MRONJ, composto por pacientes que manifestaram a doença, e não MRONJ, composto por pacientes que não manifestaram a doença. Um total de 23 pacientes com MRONJ foram identificados. Dezenove pacientes apresentaram BRONJ: oito no estágio 2; cinco no estágio 0; quatro no estágio 1; e dois no estágio 3. Dos três pacientes com DRONJ, dois foram classificados como estágio 3 e um como estágio 2. Os autores não descreveram o protocolo de tratamento para um paciente que manifestou MRONJ no estágio 1. Embora nenhuma diferença estatisticamente significativa tenha sido relatada pelos autores, a maioria dos pacientes BRONJ estavam no estágio 2, enquanto os pacientes DRONJ estavam principalmente no estágio 3.

Um ensaio clínico randomizado com 1.597 pacientes avaliou a capacidade dos medicamentos ZA e DMAb de retardar a manifestação de eventos relacionados ao osso em pacientes com câncer avançado (8). Neste estudo, Henry e colaboradores não observaram diferença entre BRONJ e DRONJ em termos de aspectos clínicos, embora os pacientes não tenham sido classificados pelo estágio da doença.

A incidência, os fatores de risco e os resultados de MRONJ foram avaliados em um estudo de Saad e colaboradores, que identificou 89 pacientes com MRONJ: 37 casos relacionados a BFs e 52 relacionados ao DMAb (47). Esses pacientes apresentavam metástases ósseas e tumores sólidos ou mieloma múltiplo. Não houve diferença significativa na incidência cumulativa entre os dois grupos.

Quatro estudos descreveram e compararam os aspectos de imagem da BRONJ e da DRONJ (11, 38, 45, 46). Em uma análise de radiografias panorâmicas faciais, Klingelhöffer e colaboradores (46) identificaram os seguintes achados de imagem nos pacientes tratados com BF e DMAb: sequestro ósseo (apenas em pacientes tratados com BF); esclerose óssea (BF e DMAb); alveolo persistentemente visível (ambos); cortical alveolar realçada (ambos); perda da cortical alveolar (ambos); realce do canal da mandíbula (ambos); periostite proliferativa (ambos); e processo osteolítico no córtex (ambos). Os grupos BF e DMAb não foram estatisticamente diferentes, exceto para o realce do canal da mandíbula, que foi mais evidente nos pacientes tratados com DMAb ($p = 0,047$).

Baba e colaboradores investigaram a MRONJ por meio de exames de tomografia computadorizada com o objetivo de determinar as diferenças radiográficas entre BRONJ e DRONJ (11). Setenta e quatro pacientes com MRONJ foram avaliados: 64 relacionadas com BF e 10 relacionadas com DMAb. Aspectos como localização da lesão, textura óssea interna, presença de sequestro ósseo, extensão do sequestro, reação periosteal, perfuração cortical, expansão óssea e fratura patológica foram avaliados. Os autores observaram que grandes sequestros ósseos e reações periosteais foram significativamente mais frequentes em pacientes com DRONJ do que em pacientes com BRONJ ($p < 0,05$), embora nenhuma diferença no número de sequestros tenha sido encontrada.

Heim e colaboradores avaliaram a densidade do osso alveolar mandibular contralateral à osteonecrose em pacientes com BRONJ e DRONJ por meio de tomografias computadorizadas, e compararam esses pacientes a um grupo de referência composto por pacientes não tratados (45). O osso trabecular da mandíbula

foi avaliado em dois locais diferentes: a região anterior ao forame mental e a região retromolar. Valores mais altos de densidade óssea foram observados no grupo BRONJ, em comparação aos grupos DRONJ ($p = 0,049$) e controle ($p = 0,023$). Essa diferença só foi significativa na região anterior ao forame mental. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos DRONJ e controle.

Pichardo e colaboradores compararam a frequência dos achados imaginológicos por análise de tomografias computadorizadas de feixe cônico de pacientes com BRONJ e DRONJ (38). Esses autores relataram que o sequestro ósseo e a lise da borda cortical da mandíbula foram significativamente menos frequentes nos pacientes com DRONJ do que nos pacientes com BRONJ ($p = 0,015$ e $p = 0,033$, respectivamente). Os autores não observaram nenhuma diferença significativa na gravidade entre os grupos BRONJ e DRONJ ($p = 0,169$) quanto ao estadiamento. Eles também relatam que a duração mediana da terapia antirreabsortiva antes do início da MRONJ foi de 18 meses (intervalo: 8–48 meses) no grupo DMAb, enquanto a mediana foi de 42 meses (intervalo: 18–120 meses) no grupo BFs.

Todos os sete estudos apresentaram risco baixo ou moderado de viés. Estudos transversais resultaram em um risco de viés de 55,5%, 77,7%, 75%, 100% e 66,6%, respectivamente (11, 38, 44-46). Os ensaios clínicos randomizados resultaram em um risco de viés de 80% e 66,6%, respectivamente (8, 47).

8.3 SÍNTESE DE RESULTADOS

Esta revisão sistemática identificou sete estudos que preencheram os critérios de inclusão e compararam os aspectos clínicos ou imaginológicos da BRONJ e da DRONJ. Os resultados desses estudos estão resumidos na Figura 5. Embora os BFs e o DMAb atuem por meio de mecanismos farmacológicos diferentes, três estudos relataram que os medicamentos resultaram em MRONJ com características clínicas semelhantes (8, 38, 47). Embora um estudo tenha relatado que pacientes tratados com BFs apresentavam melhor condição clínica, essa observação não foi estatisticamente significativa (44). Em quatro estudos, diferenças estatisticamente significativas entre a BRONJ e a DRONJ foram observadas em aspectos de imagem (11, 38, 45, 46). Heim e colaboradores (45) e Pichardo e colaboradores (38) identificaram um aumento no sequestro ósseo, na lise óssea cortical e na densidade óssea na

BRONJ, enquanto Baba e colaboradores (11) e Klingelhöffer (46) observaram sequestro ósseo maior, reações periosteais mais frequentes e realce do canal da mandíbula na DRONJ. Dos estudos que avaliaram as características de imagem, três analisaram tomografias (11, 38, 45). Considerando o risco de viés de cada um dos estudos incluídos, seus resultados apoiam a hipótese de que a BRONJ e a DRONJ são clinicamente semelhantes, mas radiograficamente distintas. A BRONJ e a DRONJ apresentam aspectos imaginológicos que são significativamente mais frequentes em uma condição do que na outra, conforme ilustrado na Figura 8.

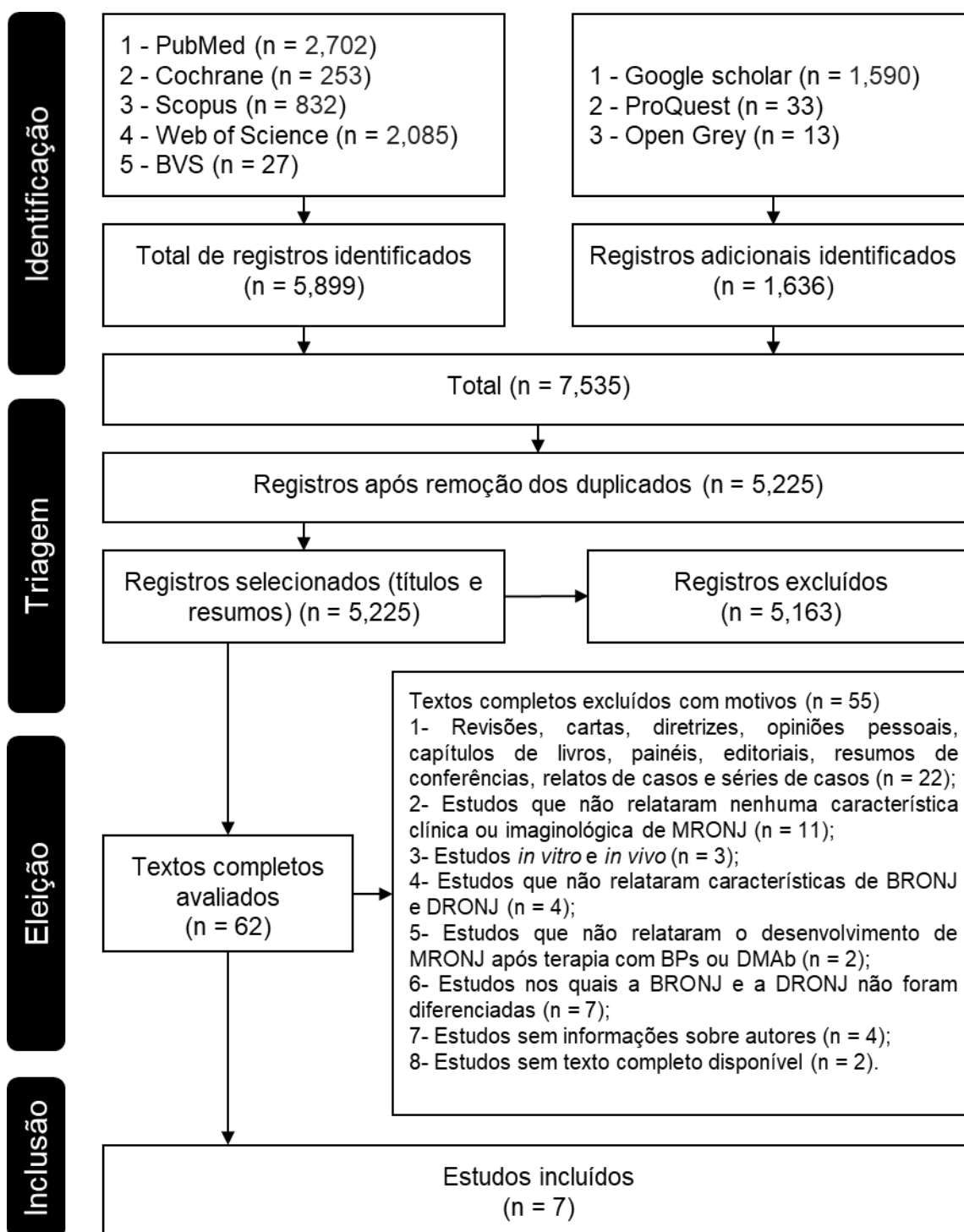


Figura 7 Fluxograma da busca na literatura e da seleção de estudos, adaptado do PRISMA. De 5.225 artigos (após a remoção das dos duplicados), 62 foram selecionados na fase 1 de seleção do estudo (após avaliação dos títulos e resumos) e 7 foram incluídos na fase 2 (após leitura do artigo completo).

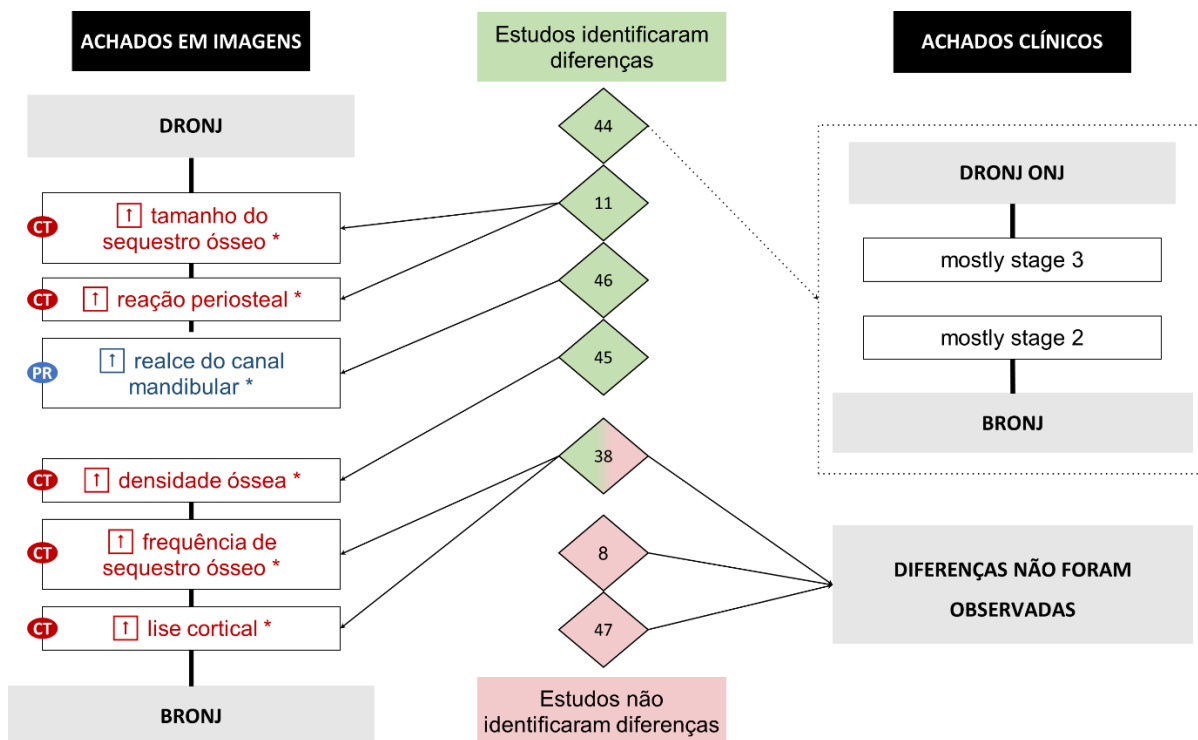


Figura 8 Resumo dos resultados. Os principais resultados de cada estudo incluído (representados no centro por seus números de referência dentro dos diamantes) são apresentados. As diferenças entre a BRONJ e a DRONJ são resumidas de acordo com os achados imaginológicos ou clínicos. BRONJ = osteonecrose por uso de bisfosfonato; DRONJ = osteonecrose por uso de denosumabe; TC = Achados observados em exames de Tomografia Computadorizada; PR = Achados observados em radiografias panorâmicas; * = significância estatística observada no estudo $p < 0,05$.

Continua

Tabela 3 – Características descritivas dos artigos incluídos (n=7)

Características dos Estudos		Características da População			Características da Intervenção	Resultados Principais		
Autor, Ano e País	Tipo de estudo	Objetivo	Número de pacientes, Sexo, Idade (em anos)	Doença subjacente	Amostra de Interesse	Intervenção	Conclusão	Resultados de Interesse
Henry et al, 2014 (8) EUA	ECR	Comparar DMAB e ZA em relação à eficácia e segurança como meio de retardar a manifestação de eventos relacionados ao esqueleto em pacientes com tumores sólidos.	1,597 pacientes F: 568 (IM: 59) M: 1,029 (IM: 61)	Metástase óssea relacionada a tumores sólidos, exceto câncer de mama.	BF: 797 pacientes (F: 299 M: 498) DMAB: 800 pacientes (F: 269 M: 531)	Avaliação do tempo até a manifestação do primeiro evento relacionado ao esqueleto. BF: IV, Z, 4 mg DMAB: SC, 120 mg	O DMAB injetado mensalmente por via subcutânea foi mais eficiente quando comparado ao ZA.	DRONJ: 6 pacientes (0,8% da população estudada) BRONJ: 9 pacientes (1,1% da população estudada) A incidência, as características e a resolução foram semelhantes quando a DRONJ e a BRONJ foram comparadas.
Saad et al, 2011 (47) Canadá	ECR	Definir a incidência, os fatores de risco e os resultados do tratamento de MRONJ em pacientes de risco que estão sob terapia antirreabsortiva.	5,723 pacientes (Idade: 18 ou mais) F: 2,667 M: 3,056	Câncer de mama, câncer de próstata, outros tumores sólidos e mieloma múltiplo.	BF: 2,861 pacientes DMAB: 2,862 pacientes	Identificação de sinais e sintomas de MRONJ por meio de exame visual da cavidade oral a cada 6 meses, enquanto os pacientes permaneceram inscritos no estudo, avaliação de fatores de risco sistêmicos, qualidade de vida relacionada à saúde. BF: IV, Z, 4 mg DMAB: SC, 120 mg 4 semanas	MRONJ não foi frequente. O tratamento foi predominantemente conservador. A cicatrização ocorreu em mais de um terço dos pacientes.	DRONJ: 52 pacientes Mandíbula: 34 pacientes (65,4%) Maxila: 15 pacientes (28,8%) BRONJ: 37 pacientes Mandíbula: 31 pacientes (83,8%) Maxila: 5 pacientes (13,5%) A incidência cumulativa de MRONJ não foi significativamente diferente entre os dois grupos. MRONJ ocorreu principalmente na mandíbula, independentemente da medicação.

Continuação

Tabela 3 – Características descritivas dos artigos incluídos (n=7)

Características dos Estudos		Características da População			Características da Intervenção	Resultados Principais		
Autor, Ano e País	Tipo de estudo	Objetivo	Número de pacientes, Sexo, Idade (em anos)	Doença subjacente	Amostra de Interesse	Conclusão	Resultados de Interesse	
Baba et al, 2018 (11) Japão	Transversal	Investigar as características de imagem de MRONJ obtidas a partir de tomografias e esclarecer as distinções radiográficas entre a BRONJ e a DRONJ.	74 pacientes F: 60 M: 14 IM: 76.4	Osteoporose, câncer de mama, câncer de próstata, mieloma múltiplo, artrite reumatóide, câncer renal, câncer gástrico, câncer colorretal.	BF: 64 pacientes DMAb: 10 pacientes	Avaliação das características da MRONJ em imagens tomográficas e das diferenças entre a BRONJ e a DRONJ.	A TC pode ser considerada um padrão-ouro para avaliar a extensão da doença. O estudo foi o primeiro a comparar os aspectos de imagem da BRONJ e da DRONJ. Novos achados nas características de imagem de MRONJ foram relatados.	DRONJ: 10 (13,5%). BRONJ: 64 (86,5%). O sequestro ósseo e as reações periosteais maiores foram significativamente mais frequentes nos pacientes com DRONJ do que nos pacientes BRONJ. Nenhuma diferença no número de sequestros ósseos foi observada.
Heim et al, 2019 (45) Alemanha	Transversal	Investigar e avaliar as mudanças na densidade óssea alveolar de pacientes com MRONJ por meio da análise de tomografias computadorizadas da mandíbula.	101 pacientes F: 49 M: 52 IM: 72.2 Idade: 41- 91	Câncer de próstata, câncer de mama, câncer de pulmão, Osteoporose, Câncer de rins, Câncer de origem desconhecida, Mieloma múltiplo.	BF: 35 pacientes DMAb: 26 pacientes Grupo de referência: 40 pacientes	Análise da diferença na densidade óssea da mandíbula entre pacientes com BRONJ e DRONJ.	BF mudou a microarquitetura do osso alveolar ao se depositar no osso. A vascularização prejudicada pode comprometer o osso alveolar e torná-lo mais vulnerável à MRONJ.	DRONJ: 26 pacientes BRONJ: 35 pacientes A densidade óssea da mandíbula foi maior em pacientes com BRONJ do que em pacientes com DRONJ.
Klingelhoffe r et al, 2016 (46) Alemanha	Transversal	Identificar a correlação entre os aspectos radiográficos e os riscos de BRONJ e DRONJ.	120 pacientes IM: 67.6 (grupo experimental) e 63.7 (grupo controle)	Sem informação.	BF: 51 pacientes DMAb: 2 pacientes BF e DMAb: 7 pacientes	Avaliação de radiografias panorâmicas de pacientes submetidos a terapia antirreabsortiva que manifestaram ou não MRONJ.	As radiografias de pacientes em terapia antirreabsortiva que manifestaram MRONJ registraram alterações frequentes na estrutura óssea.	DRONJ: 6 pacientes BRONJ: 26 pacientes O realce do canal mandibular foi mais evidente no grupo DMAb.

Conclusão

Tabela 3 – Características descritivas dos artigos incluídos (n=7)

Características dos Estudos		Características da População			Características da Intervenção	Resultados Principais		
Autor, Ano e País	Tipo de estudo	Objetivo	Número de pacientes, Sexo, Idade (em anos)	Doença subjacente	Amostra de Interesse	Intervenção	Conclusão	Resultados de Interesse
Matsui et al, 2015 (44) Japão	Transversal	Avaliar retrospectivamente os resultados do tratamento clínico e o prognóstico em pacientes com MRONJ, classificados de acordo com a Associação Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais	106 pacientes (1 paciente teve MRONJ, mas a medicação não era conhecida) F: 88 M: 18 IM: 74.8 (MRONJ) 72.1 (sem MRONJ)	Osteoporose, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de estômago, fratura, reumatismo e doença desconhecida.	BF: 83 pacientes sem MRONJ e 17 pacientes com MRONJ DMAb: 5 pacientes com MRONJ	Revisão retrospectiva das características e dos resultados do tratamento de 106 pacientes internados em um hospital de referência entre 2012-2014. A análise de regressão logística múltipla foi realizada para avaliar a correlação entre as variáveis clínicas e a progressão da doença.	Além da análise das características, foi possível observar que a análise de PCR, colesterol total e número de lesões apicais provavelmente têm alguma correlação com os resultados do tratamento da MRONJ na análise de regressão logística.	Dos pacientes que não tinham MRONJ e que necessitaram de tratamento odontológico, 1 paciente manifestou MRONJ relacionada a BF após o tratamento. DRONJ: 5 pacientes (21,8%) BRONJ: 17 pacientes (73,9%) A maioria dos pacientes com BRONJ estava no estágio 2, enquanto os pacientes com DRONJ estavam principalmente no estágio 3. Os casos ocorreram principalmente na mandíbula (65,2%).
Pichardo et al., 2019 (38) Países Baixos	Transversal	Comparar as anormalidades radiográficas entre a BRONJ e a DRONJ por meio de TCFC.	34 pacientes F: 21 pacientes M: 13 pacientes IM: 69	Osteoporose, Câncer de mama, Câncer de próstata, Câncer de pulmão.	BF: 17 pacientes DMAb: 17 pacientes	Comparação por meio de TCFC das anormalidades ósseas existentes em pacientes com DRONJ e BRONJ.	A DRONJ pode apresentar características clínicas e radiológicas que diferem da BRONJ.	DRONJ: 17 pacientes BRONJ: 17 pacientes Sequestro e destruição do osso cortical são significativamente menos comuns no grupo DMAb do que no grupo BF. Nenhuma diferença significativa na gravidade da MRONJ entre os grupos BFs e DMAb.

Abreviações: ECR Ensaio clínico randomizado, DMAb Denosumabe, ZA Ácido zoledrônico, F sexo feminino, M sexo masculino, IM idade média, BF Bisfosfonatos, IV Intravenoso, SC Subcutâneo, DRONJ Osteonecros por uso de denosumabe, BRONJ Osteonecrose por uso de bisfosfonatos, TC Tomografia computadorizada, TCFC Tomografia computadorizada de feixe cônico

9 DISCUSSÃO

Apesar da extensa quantidade de pesquisas realizadas sobre a MRONJ, ainda há muitos pontos para serem elucidados sobre esta doença. Com o objetivo principal de caracterizar alterações clínicas e imaginológicas associadas à osteonecrose por uso de medicamentos, os protocolos propostos apresentam como diferenciais importantes terem mostrado que alterações estruturais ocorrem previamente à extração dentária e no lado contralateral da mandíbula sem a exposição ao fator desencadeante, e que a MRONJ se manifesta como um conjunto de aspectos de imagem de forma diferente dependendo da droga antirreabsortiva associada, BFs ou DMAb. Estes estudos corroboram com a hipótese de que a MRONJ é uma condição ampla e diversa, não caracterizada apenas pela exposição de osso necrótico no meio oral.

Em relação ao estudo experimental, um diferencial deste protocolo é ter avaliado as alterações estruturais ósseas tanto na região de exodontia, considerada a área afetada, quanto no lado contralateral da mandíbula, sem exodontia. Além disso, todas as análises microtomográficas qualitativas e quantitativas do grupo ZA foram comparadas com as do grupo controle, em que o procedimento cirúrgico também foi realizado do lado esquerdo. A análise inicial (T0) permitiu a confirmação da normalidade em cada grupo estudado. Após a administração de ZA e antes do trauma local (T1), o osso mandibular apresentou alterações microestruturais precoces detectadas pelos parâmetros microtomográficos Tb.Th e BV/TV. A terceira avaliação (T2) confirmou as alterações ósseas no grupo experimental e apontou o papel da extração dentária no desenvolvimento da osteonecrose.

Em todas as fases experimentais, foram verificados valores médios de densidade óssea maiores no grupo ZA em comparação com o grupo controle, porém as diferenças não foram estatisticamente significativas. Foram observados valores médios de espessura trabecular (Tb.Th) maiores no grupo experimental nas áreas afetadas e não afetadas antes da exodontia (T1). As diferenças de T0 a T1 foram estatisticamente significativas apenas no grupo ZA. Esses resultados sugerem que esse parâmetro ósseo deve ser investigado como um potencial marcador ósseo inicial de MRONJ. Após a extração dentária (T2), Tb.Th continuou a aumentar na área afetada do grupo ZA e do grupo controle, onde ocorreu o trauma local, o que indica

que o trauma local pode ter influenciado as medidas. Nossos resultados estão de acordo com um estudo anterior realizado a partir de amostras de sequestro ósseo associado a implantes dentários de pacientes em uso de BF que apresentou valores maiores dos parâmetros Tb.Th e BV/TV em osso com necrose quando comparado com osso saudável (48).

BV/TV é um parâmetro utilizado para avaliar a remodelação óssea porque reflete ganho ou perda óssea. No presente estudo, o comportamento desse parâmetro ósseo foi semelhante ao parâmetro Tb.Th, com valores médios maiores no grupo experimental. Da mesma forma, Junquera e colaboradores também encontraram valores mais elevados de BV/TV em sequestro ósseo mandibular de humanos (48). Apesar das diferenças metodológicas entre os dois estudos, os resultados apontaram o possível papel do BV/TV como um marcador ósseo precoce da MRONJ. Em modelo animal, outros autores também verificaram valores maiores de BV/TV em ratos em uso de BFs do que em animais tratados com solução salina (49).

Estudos anteriores indicaram a densidade mineral óssea como um potencial marcador ósseo para prever o risco de MRONJ em pacientes que tomam medicamentos antirreabsortivos (50-52). Em um estudo com camundongos tratados com ZA, foi verificado um aumento do volume ósseo e da densidade mineral tanto em osso longo quanto na mandíbula (53). Esse estudo experimental também verificou a tendência de aumento da BMD no grupo ZA. No entanto, aumento semelhante também foi observado no grupo controle, não sendo encontradas diferenças significativas entre os grupos estudados. Deve-se enfatizar que a BMD é um parâmetro ósseo influenciado por vários fatores, como idade e forças oclusais (52, 54, 55). Os resultados de BMD do presente estudo podem ter sido influenciados pela idade e pelo pico de massa óssea dos animais estudados. Entretanto, ratos mais velhos provavelmente não suportariam o protocolo do estudo envolvendo várias etapas e procedimentos invasivos.

Após a extração dentária (T2), além das alterações nos parâmetros quantitativos microtomográficos já detectados em T1, os achados qualitativos clínicos e microtomográficos da MRONJ foram observados pela primeira vez. Apenas os animais do grupo ZA apresentaram exposição óssea, abscessos, destruição da cortical mandibular, sequestro ósseo e reação óssea periosteal. Essas características são sinais clínicos e de imagem reconhecidos de MRONJ em pacientes (1). A ocorrência dos achados clínicos somente após a extração dentária indica a

importância do trauma local, e possivelmente da infecção, no desenvolvimento das lesões com necrose e exposição óssea no meio bucal. A evidência de que o ácido zoledrônico altera a microestrutura do osso trabecular antes da extração dentária nas áreas afetadas e não afetadas pode contribuir na compreensão da patogênese do MRONJ e na avaliação precoce de pacientes em uso de medicações antirreabsortivas.

Em relação à revisão sistemática, nenhuma evidência de BFs e DMAB causando manifestações clínicas distintas de MRONJ foi observada nos estudos incluídos, e diferenças em termos de estadiamento clínico não foram verificadas estatisticamente. Embora a literatura seja escassa, há evidências suficientes para definir diferenças nos aspectos de imagem entre a BRONJ e a DRONJ. Limones e colaboradores sugerem em sua análise de incidência, risco relativo e prognóstico que o DMAb tem um risco maior de induzir a MRONJ (16). Isso corrobora as diferenças observadas nesta revisão sistemática, particularmente a presença de sequestro ósseo maior, reações periosteais mais intensas e aumento do realce do canal da mandíbula em pacientes tratados com DMAb. Apesar desses achados, o aumento no sequestro ósseo, na lise óssea cortical e na densidade óssea em pacientes tratados com BF também são relevantes.

Quatro dos estudos incluídos relataram diferenças nos achados imaginológicos entre a BRONJ e a DRONJ, embora apontem para uma direção divergente quanto a qual é a condição mais grave (38, 44-46). Baba e colaboradores e Klingelhöffer e colaboradores relataram a DRONJ como mais agressiva, enquanto Heim e colaboradores e Pichardo e colaboradores apontaram que a BRONJ é mais grave (11, 38, 45, 56). No entanto, cada um desses autores descreveu diferenças em suas análises de imagem que foram associadas de forma distinta a BRONJ ou a DRONJ.

É importante notar que um estudo (46) comparou as duas condições avaliando radiografias panorâmicas, enquanto os outros três (11, 38, 45) analisaram tomografias. Embora ambas as técnicas sejam apropriadas para observar as características de imagem da MRONJ, as tomografias computadorizadas geram imagens tridimensionais, fornecem informações mais precisas e permitem a detecção de sinais precoces de lesões (57, 58). Portanto, as tomografias são indicadas para um diagnóstico mais preciso. Ao contrário das radiografias convencionais, a TC não subestima a extensão das lesões nem a presença de pequenos sequestros ósseos (59). Treister e colaboradores relataram que as tomografias computadorizadas de

feixe cônico resultam em imagens de melhor qualidade e permitem o reconhecimento de mais características de imagem quando comparadas às radiografias convencionais (58). As alterações da mineralização óssea são consideravelmente mais perceptíveis na tomografia computadorizada, que auxilia na identificação precoce de áreas propensas à formação de sequestro ósseo, de lesões escleróticas focais, de espessamento da cortical alveolar e da reação periosteal (57).

Foram observadas limitações quanto à heterogeneidade entre os estudos incluídos. Em apenas dois estudos, as doenças subjacentes eram exclusivamente malignas (8, 43). Nos outros estudos (11, 38, 44-46), a doença subjacente era câncer, osteoporose ou artrite reumatóide. Nestes casos, a via de administração, dosagem e duração do tratamento variaram de acordo com a doença do paciente. O risco de MRONJ é cem vezes menor em pacientes com doenças não malignas, como osteoporose e artrite reumatóide, do que em pacientes com doenças malignas (1). As condições malignas frequentemente exigem um protocolo terapêutico mais intenso. Embora incomum, a MRONJ pode se manifestar em pacientes com condições não malignas submetidos a terapia antirreabsortiva oral. Esses pacientes geralmente são expostos a doses baixas e por um curto período, ao contrário dos pacientes com doenças malignas, que requerem doses mais elevadas, por via intravenosa ou subcutânea, e por um período mais longo. Portanto, a doença de base deve ser considerada ao selecionar ou agrupar pacientes para a análise da MRONJ.

Outra limitação diz respeito à falta de informação sobre a dosagem de BFs ou DMAb administrada aos pacientes, descrita em apenas três estudos (8, 38, 43), bem como de dados de incidência, descritos somente em quatro estudos (11, 44-46). Em dois estudos, os pacientes foram submetidos a protocolos de tratamento semelhantes, baseados em ácido zoledrônico 4 mg ou DMAb 120 mg a cada quatro semanas (8, 43). Em ambos os estudos, não houve diferença significativa na incidência de MRONJ entre os grupos BFs e DMAb observados. Pichardo e colaboradores relataram que os pacientes foram tratados com diferentes marcas de DMAb ou diferentes BFs em doses variadas (38). Apesar dessa variabilidade, ensaios clínicos randomizados anteriores mostram que protocolos terapêuticos de BFs ou DMAb em doses semelhantes às utilizadas nos estudos citados não resultam em uma incidência diferente de MRONJ (60-62).

Ressaltamos a necessidade de estudos mais homogêneos para que uma análise abrangente seja viável. O número de pacientes tratados com DMAb foi

visivelmente menor quando comparado aos pacientes tratados com BFs. Em alguns dos estudos incluídos, a comparação entre a MRONJ relacionada com os BFs e o DMAb foi apenas uma observação secundária, mesmo em ensaios clínicos randomizados (8, 44, 46, 47). Os estudos que comparam as características da BRONJ e da DRONJ são bastante recentes. Isso porque a osteonecrose induzida por medicamentos é em si uma condição recente e vem gradativamente se tornando um assunto de interesse para pesquisadores.

Novos estudos são necessários para confirmar se o tempo entre o primeiro uso do medicamento antirreabsortivo e a manifestação de MRONJ é menor em pacientes tratados com DMAb do que em pacientes tratados com BFs, como sugerido na literatura (16, 38, 63-65). Devido ao fato da BRONJ e da DRONJ serem condições distintas, como demonstrado nesta revisão sistemática, enfatizamos a importância do histórico médico e de uma anamnese bem conduzida para o adequado processo diagnóstico.

Por fim, os resultados destes estudos e a literatura disponível sobre a MRONJ evidenciam como ainda há muitas questões críticas a serem respondidas sobre essa doença, que tem como fatores importantes na patogênese o uso de medicamentos antirreabsortivos e o trauma ou infecção local. Mais estudos sobre as características clínicas e imaginológicas da BRONJ e da DRONJ são aconselhados visando o diagnóstico precoce, a prevenção da exposição óssea ao meio bucal e o melhor manejo clínico quando necessário.

10 PUBLICAÇÕES

10.1 EARLY BONY CHANGES ASSOCIATED WITH BISPHOSPHONATE-RELATED OSTEONECROSIS OF THE JAWS IN RATS: A LONGITUDINAL *IN VIVO* STUDY, ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY

Vilarinho JLP, Ferrare N, Moreira AMR, Moura HF, Acevedo AC, Chaves SB, et al. Early bony changes associated with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rats: A longitudinal in vivo study. Arch Oral Biol. 2017;82:79-85.

10.2 DIFFERENCES BETWEEN BISPHOSPHONATE-RELATED AND DENOSUMAB-RELATED OSTEONECROSIS OF THE JAWS: A SYSTEMATIC REVIEW, ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA SUPPORTIVE CARE IN CANCER

Querrer R, Ferrare N, Melo N, Stefani CM, Dos Reis PED, Mesquita CRM, et al. Differences between bisphosphonate-related and denosumab-related osteonecrosis of the jaws: a systematic review. Support Care Cancer. 2020.



Early bony changes associated with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rats: A longitudinal *in vivo* study



Josy Lorena Peres Vilarinho^a, Nathália Ferrare^a, Andreia Maria Rocha Moreira^a, Helora Freitas Moura^a, Ana Carolina Acevedo^b, Sacha Braun Chaves^c, Nilce Santos Melo^a, André Ferreira Leite^a, Sérgio Bruzadelli Macedo^a, Melissa Paoletti de Souza^d, Ana Tereza Bittencourt Guimarães^d, Paulo Tadeu Figueiredo^{a,*}

^a Department of Dentistry, Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Zip Code: 70910-900, Brasília, Brazil

^b Oral Care Center for Inherited Diseases, Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Zip Code: 70910-900, Brasília, Brazil

^c Biology Institute University of Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Zip Code: 70910-900, Brasília, Brazil

^d Biological Sciences Department, State University of West Paraná, Rua Universitária 2069, Cascavel, Zip Code: 85819-110, Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Medication-related osteonecrosis of the jaws
Zoledronic acid
Microcomputed tomography
Animal model

ABSTRACT

Objective: To evaluate early bony changes in an animal model of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ) at the side of the local trauma and at the contralateral side, comparing with a control group. Bony changes were evaluated by Microcomputed Tomography (MicroCT) at three time points: at baseline (T0), after drug administration (T1) and after dental extraction (T2).

Design: Two groups were compared: the experimental group in which zoledronic acid (ZA) was administered (17 rats) and the control group (13 rats). Dental extractions of the lower left first molars were performed in all animals. The left side was considered as the supposed affected area in the ZA group, and the right side was considered as the unaffected area. In these areas, the following structural microtomographic bone parameters were calculated: Bone Mineral Density (BMD), Trabecular Thickness (Tb.Th), and Bone Volume Proportion (BV/TV). The comparison of quantitative bone parameters among the different sides and experimental phases of both studied groups were performed by ANOVA-factorial.

Results: None of the animals of the control group developed MRONJ. In the ZA group, 76% presented bone exposure. From T0 to T1, Tb.Th and BV/TV increased, and in T2, the mean values were higher in ZA group than in the control group. BMD increased throughout the different phases of both groups.

Conclusions: Structural bony changes occurred in the ZA group at both mandibular sides before the dental extraction (T1). Tb.Th and BV/TV should be further investigated as potential early bone markers of MRONJ.

1. Introduction

Bisphosphonates (BPs) are antiresorptive agents whose actions interfere in bone remodeling mechanisms. These drugs bind to bone's hydroxyapatite and suppress osteoclast activity, reducing bone loss. BPs are widely used to treat several diseases which involve bone resorption such as osteoporosis, bone metastases, multiple myeloma, Paget's disease (Cremers & Papapoulos, 2011; Drake, Clarke, & Khosla, 2008). The most important side effect related to BP therapy is osteonecrosis of the jaws, firstly described in 2003 (Marx, 2003; Ruggiero et al., 2014). In the present days, the disease is known as Medication-Related

Osteonecrosis of the Jaws – MRONJ (Ruggiero et al., 2014).

MRONJ was defined as exposed or necrotic bone in the maxillofacial region for at least 8 weeks in patients receiving anti-resorptive or anti-angiogenic medications, without radiation therapy to the jaws or obvious metastatic disease to the jaws. Bone remodeling or over-suppression of bone resorption, angiogenesis inhibition, constant microtrauma, suppression of innate or acquired immunity, vitamin D deficiency, soft tissue toxicity, and inflammation or infection were proposed to explain the still uncertain pathophysiology of the disease (Ruggiero et al., 2014).

Therapy time, medication type, local trauma, local bone response,

* Corresponding author.

E-mail addresses: josylorenaps@gmail.com (J.L.P. Vilarinho), nathaliaferrare@gmail.com (N. Ferrare), andrea.ducarmo@gmail.com (A.M.R. Moreira), heloraunb@gmail.com (H.F. Moura), acevpoppe@gmail.com (A.C. Acevedo), sachabraun@unb.br (S.B. Chaves), nilce@unb.br (N.S. Melo), andreileite@unb.br (A.F. Leite), bruzadel@uol.com.br (S.B. Macedo), melissaps.bio@gmail.com (M.P. de Souza), anatbguimaraes@gmail.com (A.T.B. Guimarães), paulofigueiredo@unb.br (P.T. Figueiredo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.06.002>

Received 16 December 2016; Received in revised form 31 May 2017; Accepted 3 June 2017
0003-9969/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

genetic factors were also pointed out as risk factors related to the main etiological factors (Barasch et al., 2011; Rasmusson & Abtahi, 2014; Saad et al., 2012). Nitrogen-containing BPs's are the predominant cause of MRONJ, especially if these are administered intravenously. Zoledronic acid (ZA) is the most potent nitrogen-containing BPs, being associated to the highest risk for the disease (Cremers & Papapoulos, 2011; Mücke, Krestan, Mitchell, Kirschke, & Wutzl, 2016).

Signals and symptoms for MRONJ are pain, dental mobility, swelling in oral mucosa, soreness, and bone exposure (Rasmusson & Abtahi, 2014). Image findings are nonspecific and include bone sclerosis, osteolytic changes, bone sequestrum, periosteal reaction and fracture of the jaws. Computed tomography (CT) is the more sensible imaging method for evaluating bony changes, providing better image resolution (Arce, Assael, Weissman, & Markiewicz, 2009; Chiandussi et al., 2006; Treister, Friedland, & Woo, 2010).

As the diagnosis of MRONJ is primarily based on clinical features, the early detection of the risk of developing an osteonecrosis in the maxillofacial area before showing exposed bone is still a challenge. Some imaging tools may aid in the identification of early bony changes (Taniguchi et al., 2016). Early detection of MRONJ and the ability to predict the areas where MRONJ might arise are important for the effective management of these patients.

Some authors have demonstrated that high alveolar bone density might be a risk factor for MRONJ (Takaishi, Ikee, Nakajima, Miki, & Fujita, 2010). By measuring Computed Tomography (CT) values of cancellous bone, other authors verified that these imaging measurement could be considered as a potential method for detecting the early stages of MRONJ (Hamada, Matsuo, Koizumi, Satomi, & Chikazu, 2014). A recent study verified that CT values for cancellous bone at both affected and unaffected areas of MRONJ patients were significantly higher than those of the healthy group (Taniguchi et al., 2016). In animal models, Microcomputed Tomography (MicroCT) has been used for evaluating bony changes associated with MRONJ (Bi et al., 2010; Howie et al., 2015; Kim, Tatad, Landayan, Kim, & Kim, 2015).

MicroCT is the best imaging technique for evaluating bone morphology and microarchitecture in mice and other small animal models. The MicroCT devices achieve an isotropic voxel size of as low as few micrometers, which is sufficient for investigating structures such as mouse trabeculae that have widths of approximately 30–50 μm (Bouxsein et al., 2010).

Several previous animal models have utilized tooth extraction and high-dose bisphosphonates to reproduce clinical and imaging findings of MRONJ in humans. Nevertheless, the pathophysiology of the disease remains uncertain (Abtahi, Agholme, Sandberg, & Aspenberg, 2012; Ali-Erdem et al., 2011; Allen & Burr, 2008; Bi et al., 2010; Biasotto et al., 2010; Hokugo et al., 2010; Howie et al., 2015; Huja et al., 2011; Kobayashi et al., 2010; Marino et al., 2012; Perilli et al., 2010; Senel et al., 2010; Zandi et al., 2016). These aforementioned studies have not yet verified the time at which bony changes appear, as well as whether imaging findings precede clinical changes, such as bone exposure. We hypothesized that microtomographic bony changes may occur before dental extraction in rats receiving BP therapy, and that these bony changes can be found not only at the side of the local trauma, but also at the contralateral side, which had received the same pharmacological treatment but no tooth extraction. Therefore, the aim of this study was to evaluate early bony changes in an animal model of MRONJ at the side of the local trauma and at the contralateral side, comparing with a control group.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

The study protocol was approved by the Ethics Committee in Animal Use of the University of Brasilia, Brazil (UnBDOC 5772/2015).

The experimental procedures followed the ARRIVE guidelines, the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH), as well as Brazilian Society of Laboratory Animal Science (COBEA).

2.2. Study design

2.2.1. Animals

The initial sample comprised forty female rats (*Rattus norvegicus*). The animals were randomly selected and housed in polypropylene cages (4 per cage) with average temperatures of $23 \pm 2^\circ\text{C}$ and 12 h light/dark cycle. Water and food were provided *ad libitum*. After 2 weeks of acclimatization, the rats were randomly divided into two groups: Zoledronic Acid (ZA) and control groups. They were anesthetized and sedated (ketamine 10%, 90 mg/kg; xylazine 2%, 15 mg/kg) when necessary to perform the experiments.

2.2.2. Medication

Animals from ZA group received Zometa[®] 4 mg/5 ml (Novartis, Pharma, Basel, Switzerland), 66 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Control animals received a saline solution in similar volume dosage. The rats were weighted before every experimental phase to properly dose the administered drugs, as well as for controlling weight gain or loss during the study. The medication was administered by intraperitoneal injection thrice a week, for three weeks according to Zandi et al. (2016). This protocol was previously tested in a pilot study. At the time of zoledronate administration, the mean age of the rats was 8 weeks and the mean weight was 250 g in accordance with previous studies (Bi et al., 2010; Ponte et al., 2016).

2.2.3. Dental extraction

Dental extractions were performed in animals of both groups (ZA and control) three weeks after beginning the bisphosphonate therapy. Animals were previously anesthetized with ketamine 10%, 90 mg/kg and xylazine 2%, 15 mg/kg. The lower left first molars were extracted by the same operator in both groups with a dental explorer. After the extraction, the animals were carefully assisted and analgesics were administered twice a day, for two days (tramadol, 60 mg/kg/day). The animals were weighed twice a week during the following six weeks. Behavior, ability to feed and presence of external injuries in the oral region were observed.

2.2.4. Visual examination

Clinical analyses were performed by a single examiner in a lighted room to visually determine the presence of bone exposure, abscesses or fistulae at the three phases of the experiment (T0, T1 and T2). The visual assessment also aimed to verify the onset of MRONJ after extraction.

2.2.5. Microtomography assessment

MicroCT scans were performed by using an *in vivo* SkyScan 1076 device (Bruker, Kontich, Belgium). The technical parameters were 18 μm pixel size, 100 kV, 100 μA , Al 1.0 mm filter, rotation step of 0.44, frame averaging of 5 and 37 min of average scanning time. The three-dimensional images reconstructions were obtained with ring artifact, smoothing and beam-hardening correction set at 14th position, one level and 55%, respectively (NRecon software with GPU acceleration, 1.6.9 version, Bruker, Kontich, Belgium). In total, the study comprised three different experimental phases of MicroCT evaluation.

T0: The baseline microCT examination occurred in experimental day 0, before medication and dental extractions, to analyze baseline qualitative and quantitative bony changes.

T1: The second microCT scanning was performed after three weeks of medication to investigate bony changes associated with the zoledronic acid intake, prior to the dental extractions.

T2: The last microCT images were acquired six weeks after the

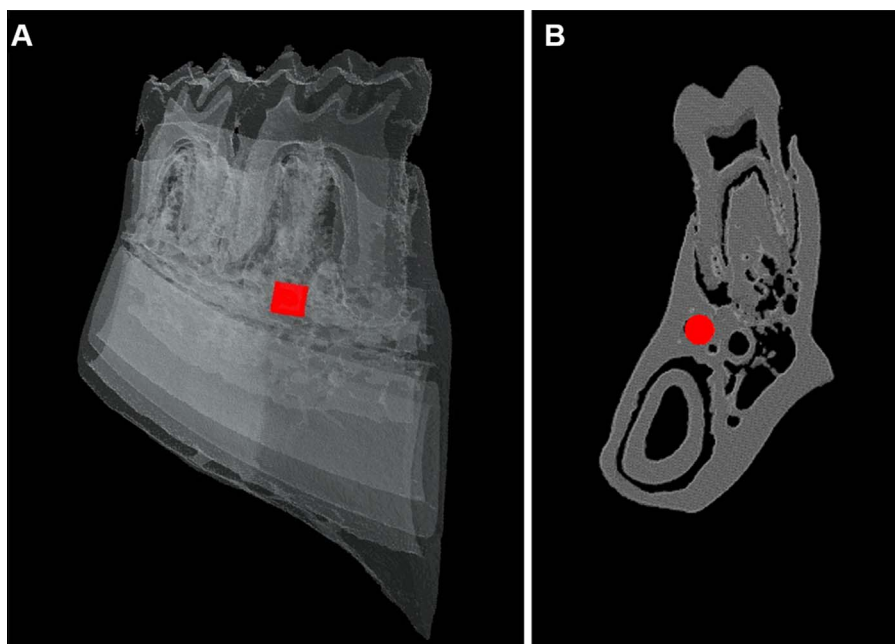


Fig. 1. MicroCT 3D reconstruction images showing the selected Volume of Interest (VOI) in the mandibular bone of a studied animal. A – 3D lateral view showing the selected VOI. B – 3D coronal image of the VOI.

dental extractions to evaluate bony changes associated with osteonecrosis of the jaws.

One experienced radiologist analyzed the images using Dataviewer (1.5.0 version) and CTAn (1.13 version) software (Bruker, Kontich, Belgium) and a 24 in. monitor (UltraSharp™ U2410, Dell, Rio Grande do Sul, Brazil) in a dark room blinded for animal group identification. A three-dimensional cylindrical volume of interest (VOI) with a section diameter of 561.2 μm and length of 540 μm (30 layers), located below the middle lingual root of the first molar, between the lingual cortical and the mandibular canal, was defined for the right and the left mandible sides (Fig. 1). The left side, in which dental extractions were performed in both studied groups, represented an area with an induction factor for MRONJ in the ZA group (supposed affected area). The right side represented an area not exposed to the mechanical trauma (without dental extraction) named as “unaffected area”. The right side was measured in order to verify the effects of ZA in the bone not exposed to the risk factor. Regarding the quantitative analyses of Micro CT, within the selected VOI, some morphometric bone parameters were calculated following previous authors (Bouxsein et al., 2010; Junquera, Pelaz, Gallego, Garc & a-Consuegra, & Costilla, 2014; Lee, Kim, & Yun, 2017).

- **Bone Mineral Density:** This parameter is calculated from the average attenuation value of the selected bone tissue. A calibration phantom is necessary to relate CT values to a mineral equivalent value, normally in milligrams per cubic centimeter (mg/cm^3) of calcium hydroxyapatite (HA) from a solid-state phantom. In this calibration process, the grayscale dataset was transformed into Hounsfield units (HU), and HU values of two hydroxyapatite phantom scans (0.25 and 0.75 gHA/cm^3) were used to calibrate the density scales against HU units.
- **Trabecular Bone Thickness (Tb.Th, μm):** It is a measurement of the average width of bone structure.
- **Bone Volume Fraction (BV/TV):** It is a measurement of bone quantity, represented by the proportion of the selected VOI occupied by trabeculae (%) (Junquera et al., 2014; Lee et al., 2017).

The same examiner also registered the following qualitative MicroCT findings associated with MRONJ: cortical bone destruction, periosteal reaction and bone sequestration in the three experimental phases. Animals from each study group were euthanized after T2

experimental phase over exposure to CO₂.

2.3. Statistical analysis

All statistical analyses were performed by Statistica 7.0 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA). A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant. Descriptive analysis were presented for the microCT parameters data based on groups, assessment phase and mandible side. Once an experiment was performed in a completely randomized field of study, the data were evaluated using parametric tests. The factorial analysis of variance (ANOVA) for repeated measures was used to compare the groups during the three phases of the experiment, followed by (LSD)-Fisher test in case of statistical significance. The chi-square test was used to compare qualitative variables between ZA and control groups.

3. Results

The initial sample consisted of 40 animals. However, four animals were excluded from the study due to motion artifacts on the MicroCT scans. Two animals were excluded due to accidental extraction of the second molar during the surgical procedure. Four animals died after anesthesia or sedation procedures. Therefore, the final sample consisted of 30 animals, 13 of the control group and 17 of the group treated with ZA. Weight did not differ significantly in animals from the ZA and control groups throughout the experiment.

3.1. Visual clinical assessment

The clinical characteristics of the studied animals were only detected in the last phase of the experiment (T2), after dental extractions. None of the animals in the control group had bone exposure or other characteristic clinical signs associated to MRONJ. On the other hand, 14 (78%) of the ZA group animals presented this characteristic clinical feature of MRONJ ($p < 0.001$, chi-square). Abscesses or fistulas were also found only in the experimental group, in 3 animals (18%, $p = 0.110$, chi-square).

Table 1

Comparison of mean values of all structural MicroCT bone parameters at the right side (unaffected area) among zoledronic acid group and control group

	Zoledronic acid group						Control group					
	T0		T1		T2		T0		T1		T2	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
BMD	0.403 ^{aA}	0.074	0.546 ^{bA}	0.064	0.603 ^{bA}	0.083	0.332 ^{aA}	0.116	0.440 ^{bA}	0.142	0.492 ^{bA}	0.130
Tb.Th	89.455 ^{aA}	17.341	130.901 ^{bA}	22.850	150.029 ^{bA}	24.513	84.387 ^{aA}	20.169	113.438 ^{aA}	28.131	108.322 ^{aB}	22.953
BV/TV	27.464 ^{aA}	8.693	46.113 ^{bA}	8.561	53.007 ^{bA}	9.552	22.270 ^{aA}	12.492	34.180 ^{bA}	17.516	38.079 ^{bB}	15.244

BMD – Bone Mineral Density, Tb.Th – Trabecular Thickness, BV/TV – Bone Volume Proportion, T0 – baseline MicroCT evaluation, T1 – MicroCT evaluation after drug administration and before dental extraction, T2 – MicroCT evaluation after dental extraction

^{a,b,c}Within-group comparisons (row): means followed by the same lowercase letter are not significantly different for animals from the zoledronic group or those from the control group (p > 0.05).

^{A,B,C}Between-group comparisons (row): means followed by the same capital letter are not significantly different between ZA and control groups (p > 0.05).

3.2. Comparison of structural bone parameters at the right side among ZA group (unaffected area) and the control group

Table 1 presents the comparison of mean values of all structural microCT bone parameters at the right side among ZA group (unaffected area) and the control group.

In both ZA and control groups, mean BMD values were higher in T2/T1 than in T0. Although there was a tendency of higher BMD values in the ZA group, no significant differences were found between mean BMD values at the right side among ZA and control groups for each experimental phase (T0, T1 and T2).

Tb.Th increased from T0 to T1 in the ZA group, but was not different throughout the three experimental phases in the control group. After dental extraction (T2), Tb.Th was significantly higher in the ZA group than in the control group.

BV/TV increased from T0 to T1 in both ZA and control groups. However, in T2 this bone parameter was significantly higher in the ZA group.

3.3. Comparison of structural bone parameters at the left side (supposed affected area) among ZA group and the control group

Table 2 presents the comparison of mean values of all structural microCT bone parameters at the supposed affected area among ZA group and the control group.

Mean BMD values increased throughout the three experimental phases in both ZA and control groups. At this left side, although the ZA group presented higher BMD values than the control group, the differences were not statistically significant.

Tb.Th increased from T0 to T1 in the ZA group, but was not different throughout the three experimental phases in the control group. After dental extraction (T2), Tb.Th was significantly higher in the ZA group than in the control group.

Table 2

Comparison of mean values of all structural MicroCT bone parameters at the left side (affected area) among zoledronic acid group and control group.

	Zoledronic acid group						Control group					
	T0		T1		T2		T0		T1		T2	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
BMD	0.373 ^{aA}	0.076	0.485 ^{bA}	0.085	0.813 ^{cA}	0.184	0.324 ^{aA}	0.099	0.417 ^{bA}	0.128	0.705 ^{cA}	0.253
Tb.Th	81.102 ^{aA}	14.507	117.474 ^{bA}	23.349	218.191 ^{cA}	82.526	77.245 ^{aA}	18.223	101.358 ^{aA}	26.567	176.078 ^{bB}	79.575
BV/TV	25.069 ^{aA}	10.461	38.958 ^{bA}	11.089	75.967 ^{cA}	19.336	20.467 ^{aA}	11.564	32.533 ^{bA}	13.723	61.951 ^{cB}	27.330

BMD – Bone Mineral Density, Tb.Th – Trabecular Thickness, BV/TV – Bone Volume Proportion, T0 – baseline MicroCT evaluation, T1 – MicroCT evaluation after drug administration and before dental extraction, T2 – MicroCT evaluation after dental extraction

^{a,b,c}Within-group comparisons (row): means followed by the same lowercase letter are not significantly different for animals from the zoledronic group or those from the control group (p > 0.05).

^{A,B,C}Between-group comparisons (row): means followed by the same capital letter are not significantly different between ZA and control groups (p > 0.05).

BV/TV increased throughout all the three phases in both ZA and control groups. However, in T2 this bone parameter was significantly higher in the ZA group than in the control group.

3.4. Comparison of structural bone parameters at the left and right side of the mandible of the ZA and the control groups

In the control group, mean BMD values were higher at the tooth extraction side than in the right side. In the ZA group, the supposed affected area (tooth extraction side) also presented significantly higher mean BMD values than the right side.

Only in T2, the left mean values of Tb.Th were significantly higher than the right ones in both ZA and the control groups.

At the tooth extraction side, in T2 mean values of BV/TV were significantly higher in both ZA and control groups than in the right side.

When the interaction of all the studied variables (different experimental phases, studied group and mandibular sides) were evaluated together, no differences were found (p > 0.05). On the other hand, when the variables were analyzed separately, there were significant differences in the comparison of mean values of microCT bone parameters between the right and the left side, between the two groups (ZA and the control group), and also among the three time points (Fig. 2).

3.5. Microtomographic visual assessment

The visual microtomographic characteristics of the studied animals were also only detected after dental extractions (T2). The frequency of cortical bone destruction was significantly higher in the ZA group (41%, 7 animals) than in the control group (8%, 1 animal), p = 0.04. Periosteal reaction was only observed in the ZA group (35%, 6 animals). One animal of the ZA group (6%) had bone sequestration in the affected area of MRONJ. Thirteen animals from the ZA group (76%) presented bone exposure. An example of bone lesion at the left side of

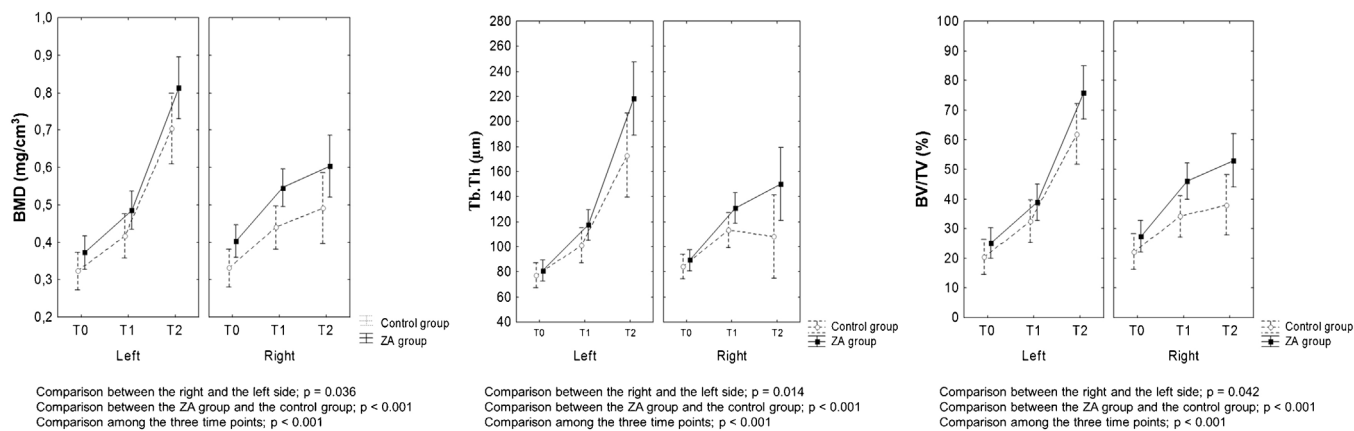


Fig. 2. Comparison of mean values and confidence intervals of all the quantitative microtomographic bone parameters: Bone Mineral Density – BMD (A), Trabecular Thickness – Tb.Th (B), and Bone Volume Proportion – BV/TV (C). All of these bone parameters were already altered after zoledronate administration and before the local trauma (T2).

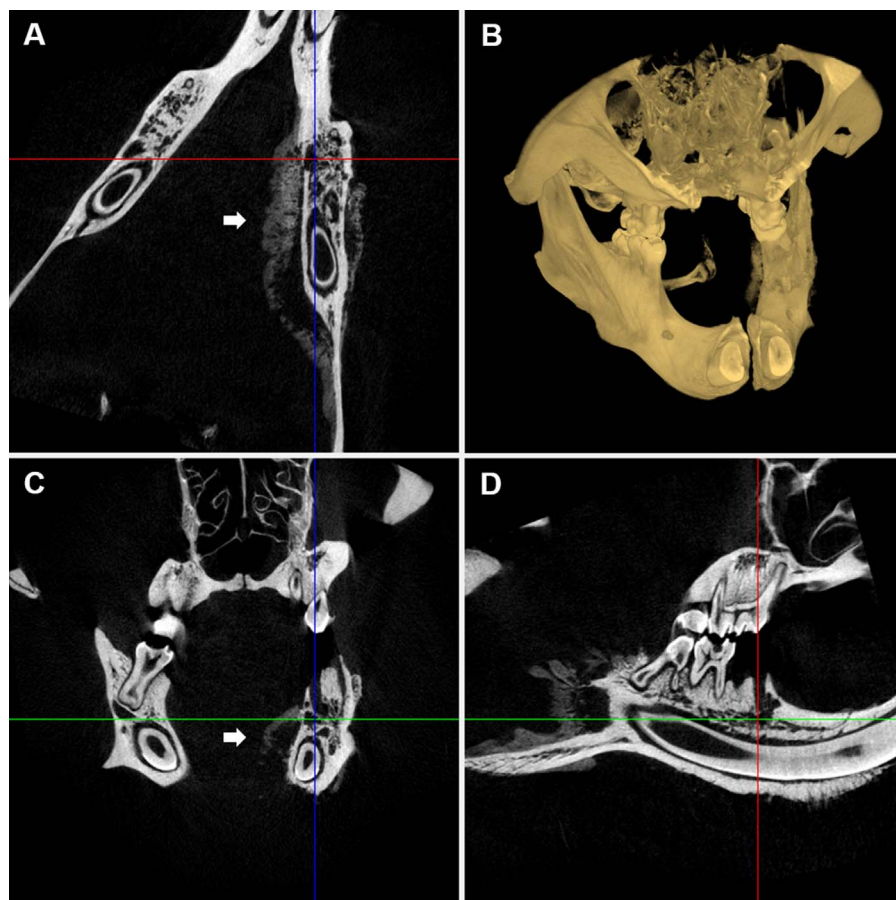


Fig. 3. Multiplanar reconstruction images (A, C, and D) and 3D image (B) of MicroCT showing osteolytic lesions and periosteal reaction in an animal from the zoledronate group (white arrows). A – Axial image. B – 3D frontal view. C – Coronal image. D – Sagittal image.

an animal from the zoledronate group, with intense periosteal reaction is shown in Fig. 3.

4. Discussion

To our knowledge, this is the first animal study that evaluated early microtomographic bony changes related to BP therapy at three time points. This study induced MRONJ using a well accepted method (zoledronate and tooth extraction). However, the bony structural changes were assessed in both, the tooth extraction region (considered as affected area) and the contralateral side of the mandible with no tooth extraction. Furthermore, all the qualitative and quantitative microtomographic analyses of the ZA group were compared with those of the control group in which the surgical procedure was also performed at the

left side. The baseline analysis (T0) allowed the confirmation of normality in each studied group. After ZA administration and before the local trauma (T1), mandibular bone showed microstructural changes detected by the MicroCT parameters Tb.Th and BV/TV. The third evaluation (T2) confirmed the bony changes in experimental group and pointed out the role of dental extraction for MRONJ onset. In all experimental phases, higher mean BMD values were also verified in the ZA group than in the control group, whereas the differences were not statistically significant.

The higher mean values of trabecular thickness (Tb.Th) in the experimental group had already been observed in both affected and unaffected areas before dental extraction (T1). The differences from T0 to T1 were only statistically significant in the ZA group. The results of the T1 phase suggest that this bone parameter should be further

investigated as a potential early bone marker of MRONJ. After dental extraction (T2) this bone parameter continued to increase in the affected area of the ZA group (left side), and also at the left side of the control group in which the local trauma occurred. Therefore, this result indicated that the local trauma may have influenced the measurements. Our results are in agreement with a previous study carried out from samples of bone sequestration associated with dental implants of patients taking bisphosphonates (Junquera et al., 2014). In this previous study, Tb.Th and BV/TV presented higher values in osteonecrotic bone than in healthy bone.

BV/TV may be used in pathological studies where bone remodeling is altered because it reflects bone gain or loss (Junquera et al., 2014). In the present study, the behavior of this bone parameter was similar to Tb.Th, with higher mean values in the experimental group. Similarly, Junquera et al. (2014) also found higher values of BV/TV in mandibular bone sequestration of humans. Despite the methodological differences between both studies, the results pointed out the possible role of BV/TV as an early bone marker of MRONJ. Similarly to our study, in a previous animal protocol, some authors have verified higher BV/TV values in rats taking bisphosphonates than in animals treated with saline solution (de Molon et al., 2015).

Several previous studies have indicated BMD as a potential bone marker for predicting the risk of MRONJ in patients taking anti-resorptive agents (Takaishi et al., 2010; Taniguchi et al., 2016; Tohashi, Nakabayashi, Kodani, Kidani, & Ryoke, 2016). In a recent study with mice treated with ZA, some authors verified an increasing of bone volume and mineral density of both long bone and jaw (Vermeer et al., 2016). Our study also verified the same tendency of BMD increasing in the ZA group. Nevertheless, a similar increasing was also observed in the control group, and no significant differences were found among the studied groups. It should be emphasized that BMD is a bone parameter influenced by several factors such as age and occlusal forces (Liu et al., 2016; Matsumoto et al., 2017; Tohashi et al., 2016). Therefore, BMD results of the present study might have been influenced by the aforementioned variables, especially the peak bone mass of the studied animals.

Although this is the first study to describe microtomographic early bony changes in areas without extraction, a recent histological study has already verified structural bone alterations in large surface areas of the bone, as evidenced by empty osteocytic lacunae, and a marked reduction in the number of osteoblasts and osteoclasts, which could reduce bone turnover. In an animal model, after 30 and 45 days with low dose zoledronate treatment the mandibular bone underwent morphological changes that may predispose the bone to necrosis when trauma is applied (Ponte et al., 2016). Although the present study was not based on histological analysis, mandibular bony changes were observed in microCT scans of both affected and unaffected areas in the ZA group. Several authors have stated that microCT can be considered as the gold standard method to analyze bone microstructure (Bouxsein et al., 2010; Junquera et al., 2014).

Following dental extraction (T2), besides the microtomographic quantitative parameters which were already detected in T1, the qualitative clinical and microtomographic findings of MRONJ were verified for the first time. Only animals from the ZA group presented bone exposure, abscesses, destruction of mandibular cortex, bone sequestration, and bone periosteal reaction. These characteristics are MRONJ's recognized clinical and imaging signs in patients (Ruggiero et al., 2014).

In regard to the microtomographic findings, it should be emphasized the high frequency of periosteal reaction in the zoledronate group. The prevalence of this bone change appears to be lower in patients (Allen, 2015), probably because MRONJ is more frequent in older patients (Ruggiero et al., 2014). The periosteal reaction, in the present study, is probably determined by the intensity, aggressiveness, and duration of the inflammatory process related to MRONJ. The subperiosteal spread of such inflammation stimulates the new bone

formation surrounding the mandibular cortex (Rana, Wu, & Eisenberg, 2009). In a recent animal study with rodents, pro-inflammatory aspects of chronic zoledronate treatment could also be traced in the mandibular periosteum, and histological analysis supported the infiltration of the tissue by leukocytes in the neighboring necrotic zone (Janovsky et al., 2015).

Our study has strengths and limitations. Despite being the first longitudinal *in vivo* study of MRONJ, histological analysis was not performed. However, our study firstly aimed to verify microstructural bony changes in an animal model of MRONJ. For this purpose, some authors have defined that a 3-dimensional approach to the analysis of complex trabecular structure is ideally required, as there are limitations in traditional 2-dimensional (2D) histological analysis (Bouxsein et al., 2010; Junquera et al., 2016). Most animal models used young rats (Bi et al., 2010; Hokugo et al., 2010; Janovszky et al., 2015; Ponte et al., 2016). Although peak bone mass of the studied animals may have influenced our BMD results, older rats could not support the study protocol involving multiple steps and invasive procedures. It would be preferable if we could perform more MicroCT scans in order to verify the exact time when bony changes occur. However, in clinical practice this is not possible, and a higher radiation dose may interfere in the pathologic process of MRONJ. Further longitudinal imaging studies would help to clarify the onset of bony changes associated to MRONJ.

Our animal model was able to successfully induce MRONJ with zoledronate administration, following dental extraction. After dental extraction (T2), 76% of the animals from the zoledronate group presented MRONJ. This frequency is in line with previous studies (Ersan et al., 2014; Howie et al., 2015; Jang, Kim, & Cha, 2015; Zandi et al., 2016). Only at this time (T2), the characteristic clinical and tomographic findings of the MRONJ could be detected.

In conclusion, our longitudinal *in vivo* study verified structural bony changes in rats from the ZA group at both mandibular sides (affected and unaffected areas) before the dental extraction (T1). As Tb.Th and BV/TV increased from T0 to T1, and were significantly higher in T2 between the ZA group and the control group, they should be further investigated as potential early bone markers of MRONJ. The third MicroCT assessment (T2) confirmed the bony changes in experimental group and pointed out the role of dental extraction for MRONJ onset. The evidence that zoledronic acid change the microstructure of trabecular bone before dental extraction at either the affected and unaffected areas may help to improve our understanding of the pathogenesis for MRONJ.

Conflict of interest

No external funding, apart from the support of the authors' institution was available for this study. The authors declare that there are no conflicts of interest in this study.

Disclosure statements

None.

Author's roles

Study design: JV, NM, AL, PF. Study conduct: JV, NF, AM, HM, AA, SC, NM, AL, SM, PF. Data collection: JV, NF, AM, HM, AA, SC, NM, AL, SM, PF. Data analysis: JV, NF, AM, HM, AA, SC, NM, AL, SM, PF, MS and AG. Data interpretation: JV, NF, NM, AL and PF. Drafting and revising manuscript: JV, NF, AM, HM, AA, SC, NM, AL, SM, MS, AG and PF. Approving final version of manuscript: JV, NF, AM, HM, AA, SC, NM, AL, SM, MS, AG and PF takes responsibility for the integrity of the data analysis.

Acknowledgement

This work was supported by the Foundation for Research Support of the District Federal (FAP/DF), grant number 0193.000971/2015.

References

- Abtahi, J., Agholme, F., Sandberg, O., & Aspenberg, P. (2012). Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw in a rat model arises first after the bone has become exposed. No primary necrosis in unexposed bone. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, *41*, 494–499.
- Ali-Erdem, M., Burak-Cankaya, A., Cemil-Isler, S., Demircan, S., Soluk, M., Kasapoglu, C., et al. (2011). Extraction socket healing in rats treated with bisphosphonate: Animal model for bisphosphonate related osteonecrosis of jaws in multiple myeloma patients. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirurgia Bucal*, *16*, 879–883.
- Allen, M. R., & Burr, D. (2008). Mandible matrix necrosis in beagle dogs after 3 years of daily oral bisphosphonate treatment. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, *66*, 987–994.
- Allen, M. R. (2015). Medication-related osteonecrosis of the jaw: Basic and translational science updates. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, *27*, 497–508.
- Arce, K., Assael, L., Weissman, J., & Markiewicz, M. (2009). Imaging findings in bisphosphonate-related osteonecrosis of jaws. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, *67*, 75–84.
- Barasch, A., Cunha-Cruz, J., Curro, F. A., Hujoel, P., Sung, A. H., Vena, D., et al. (2011). Risk factors for osteonecrosis of the jaws: A case-control study from the CONDOR dental PBRN. *Journal of Dental Research*, *90*, 439–444.
- Bi, Y., Gao, Y., Ehrlichou, D., Cao, C., Kikuri, T., Le, A., et al. (2010). Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *American Journal of Pathology*, *177*, 280–290.
- Biasotto, M., Chiandussi, S., Zacchigna, S., Moimas, S., Dore, F., Pozzato, G., et al. (2010). A novel animal model to study non-spontaneous bisphosphonates osteonecrosis of jaw. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, *39*, 390–396.
- Bouxsein, M., Boyd, S., Christiansen, B., Guldberg, R., Jepsen, K., & Müller, R. (2010). Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of Bone and Mineral Research*, *25*, 1468–1486.
- Chiandussi, S., Biasotto, M., Dore, F., Cavalli, F., Cova, M. A., & Di Lenarda, R. (2006). Clinical and diagnostic imaging of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Dentomaxillofacial Radiology*, *35*, 236–243.
- Cremers, S., & Papapoulos, S. (2011). Pharmacology of bisphosphonates. *Bone*, *49*, 42–49.
- de Molon, R., Shimamoto, H., Bezouglia, O., Piri, F., Dry, S., Kostenuik, P., et al. (2015). OPG-Fc but not zoledronic acid discontinuation reverses osteonecrosis of the jaws (ONJ) in mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, *30*, 1627–1640.
- Drake, M. T., Clarke, B. L., & Khosla, S. (2008). Bisphosphonates: Mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clinic Proceedings*, *83*, 1032–1045.
- Ersan, N., van Ruijven, L. J., Bronckers, A. L., Olgaç, V., Ilgüy, D., & Everts, V. (2014). Teriparatide and the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: A rat model. *Dentomaxillofacial Radiology*, *43*, 20130144.
- Hamada, H., Matsuo, A., Koizumi, T., Satomi, T., & Chikazu, D. (2014). A simple evaluation method for early detection of bisphosphonate-related osteonecrosis of the mandible using computed tomography. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, *42*, 924–929.
- Hokugo, A., Christensen, R., Chung, E., Sung, E., Felsenfeld, A. L., Sayre, J. W., et al. (2010). Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with vitamin D deficiency in rats. *Journal of Bone and Mineral Research*, *25*, 1337–1349.
- Howie, R., Borke, J., Kurago, Z., Daoudi, A., Cray, J., Zakhary, I. E., et al. (2015). A model for osteonecrosis of the jaw with zoledronate treatment following repeated major trauma. *PLoS One*, *10*, e0132520.
- Huja, S., Mason, A., Fenell, C., Mo, X., Hueni, S., D'Atri, A. M., et al. (2011). Effects of short-term zoledronic acid treatment on bone remodeling and healing at surgical sites in the maxilla and mandible of aged dogs. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, *69*, 418–427.
- Jang, H., Kim, J., & Cha, I. (2015). Development of animal model for Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery*, *37*, 1–7.
- Janovszky, Á., Szabó, A., Varga, R., Garab, D., Boros, M., Mester, C., et al. (2015). Periosteal microcirculatory reactions in a zoledronate-induced osteonecrosis model of the jaw in rats. *Clinical Oral Investigations*, *19*, 1279–1288.
- Junquera, L., Pelaz, A., Gallego, L., García-Consuegra, L., & Costilla, S. (2014). Bisphosphonate-related osteonecrosis associated with dental implants: A micro-computed tomography study. *Implant Dentistry*, *23*, 258–263.
- Kim, J. W., Tatad, J. C., Landayan, M. E., Kim, S. J., & Kim, M. R. (2015). Animal model for medication-related osteonecrosis of the jaw with precedent metabolic bone disease. *Bone*, *81*, 442–448.
- Kobayashi, Y., Hiraga, T., Ueda, A., Wang, L., Matsumoto-Nakano, M., Hata, K., et al. (2010). 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. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, *28*, 165–175.
- Lee, J., Kim, H., & Yun, J. (2017). Three-dimensional microstructure of human alveolar trabecular bone: A micro-computed tomography study. *Journal of Periodontal & Implant Science*, *47*, 20–29.
- Liu, J., Liu, S., Zhao, Y., Gu, X., Li, Q., Jin, Z., et al. (2016). Effects of occlusion on mandibular morphology and architecture in rats. *Journal of Surgical Research*, *200*, 533–543.
- Mücke, T., Krestan, C., Mitchell, D., Kirschke, J., & Wutzl, A. (2016). Bisphosphonate and medication-related osteonecrosis of the jaw: A review. *Seminars in Musculoskeletal Radiology*, *20*, 305–314.
- Marino, K., Zakhary, I., Abdelsayed, R., Carter, J., O'Neill, J. C., Khashaba, R. M., et al. (2012). Development of a rat model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Journal of Oral Implantology*, *38*, 511–518.
- Marx, R. (2003). Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: A growing epidemic. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, *61*, 1115–1117.
- Matsumoto, M., de Abreu Furquim, E., Gonçalves, A., Santiago-Júnior, J., Saraiva, P., Cardoso, C., et al. (2017). Aged rats under zoledronic acid therapy and oral surgery. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, *45*, 781–787.
- Perilli, E., Le, V., Ma, B., Salmon, P., Reynolds, K., & Fazzalari, N. L. (2010). Detecting early bone changes using in vivo micro-CT in ovariectomized, zoledronic acid-treated, and sham-operated rats. *Osteoporosis International*, *21*, 1371–1382.
- Ponte, F. S., Catalfamo, L., Micali, G., Runci, M., Cutroneo, G., Vermiglio, G., et al. (2016). Effect of bisphosphonates on the mandibular bone and gingival epithelium of rats without tooth extraction. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *11*, 1678–1684.
- Rana, R., Wu, J., & Eisenberg, R. (2009). Periosteal reaction. *AJR American Journal of Roentgenology*, *193*, W259–W272.
- Rasmusson, L., & Abtahi, J. (2014). Bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw: An update on pathophysiology, risk factors, and treatment. *International Journal of Dentistry*, *2014*, 471035.
- Ruggiero, S., Dodson, T., Fantasia, J., Goodday, R., Aghaloo, T., Mehrotra, B., et al. (2014). Medication-Related osteonecrosis of the jaw – 2014 update. *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, *72*, 1938–1956.
- Saad, F., Brown, J. E., Van Poznak, C., Ibrahim, T., Stemmer, S. M., Stopeck, A. T., et al. (2012). Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: Integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. *Annals of Oncology*, *23*, 1341–1347.
- Senel, F., Duman, M., Muci, E., Cankaya, M., Pampu, A. A., Ersoz, S., et al. (2010). Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, *109*, 385–391.
- Takaishi, Y., Ikeo, T., Nakajima, M., Miki, T., & Fujita, T. (2010). A pilot case-control study on the alveolar bone density measurement in risk assessment for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Osteoporosis International*, *21*, 815–825.
- Taniguchi, T., Aji, Y., Nozawa, M., Naitoh, M., Kuroiwa, Y., Kurita, K., et al. (2016). Computed tomographic assessment of early changes of the mandible in bisphosphonate-treated patients. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, *122*, 362–372.
- Tohashi, K., Nakabayashi, M., Kodani, I., Kidani, K., & Ryoike, K. (2016). Associations between systemic markers of bone turnover or bone mineral density and anti-resorptive agent-related osteonecrosis of the jaw in patients treated with anti-resorptive agents. *Yonago Acta Medica*, *59*, 45–53.
- Treister, N., Friedland, B., & Woo, S. (2010). Use of cone-beam computerized tomography for evaluation of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, *109*, 753–764.
- Vermeer, J., Renders, G., van Duin, M. A., Jansen, I., Bakker, L. F., Kroon, S. A., et al. (2016). Bone-site-specific responses to zoledronic acid. *Oral Diseases*, *23*, 126–133.
- Zandi, M., Dehghan, A., Malekzadeh, H., Janbaz, P., Ghadermazi, K., & Amini, P. (2016). Introducing a protocol to create bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rat animal model. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery*, *44*, 271–278.



Differences between bisphosphonate-related and denosumab-related osteonecrosis of the jaws: a systematic review

Raiza Querrer¹ · Nathália Ferrare¹ · Nilce Melo¹ · Cristine Miron Stefani¹ · Paula Elaine Diniz dos Reis^{1,2} · Carla Ruffeil Moreira Mesquita¹ · Gabriel Alvares Borges^{1,3} · André Ferreira Leite¹ · Paulo Tadeu Figueiredo¹

Received: 21 May 2020 / Accepted: 23 October 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Objective Bisphosphonates and denosumab are both antiresorptive medications, each with their own mechanism of action; yet both may result in the same adverse effect: medication-related osteonecrosis of the jaw (ONJ). The present systematic review aims to answer the following question: “Are bisphosphonate-related ONJ and denosumab-related ONJ any different, regarding clinical and imaging aspects?”

Methods This review followed the Joanna Briggs Review’s Manual, and the searches were performed on PubMed, Cochrane, Scopus, Web of Science, and Lilacs databases and on the grey literature (ProQuest, Open Grey, and Google Scholar).

Results The searches resulted in 7535 articles that were critically assessed. Based on the selection criteria, seven studies were included in the review: five cross-sectional studies and two randomized clinical trials. A total of 7755 patients composed the final population. An increase in bone sequestra, cortical bone lysis, and bone density was observed in bisphosphonate-related ONJ, while larger bone sequestra, more frequent periosteal reactions, and mandibular canal enhancement were noted in denosumab-related ONJ.

Conclusion This systematic review demonstrated that the imaging characteristics of bisphosphonate-related and denosumab-related ONJ are not similar. Although clinically similar conditions, they were found to be radiographically distinct. More studies are necessary to further elucidate these differences.

Keywords Osteonecrosis · Bisphosphonates · Denosumab · Review

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00520-020-05855-6>.

✉ Raiza Querrer
querreer@gmail.com

Nathália Ferrare
nathaliaferrare@gmail.com

Nilce Melo
nilcesantasmelo@gmail.com

Cristine Miron Stefani
cmstefani@gmail.com

Paula Elaine Diniz dos Reis
pauladiniz@unb.br

Carla Ruffeil Moreira Mesquita
carlarm@globo.com

Gabriel Alvares Borges
gabriel_alvares_borges@hotmail.com

André Ferreira Leite
andreleite@unb.br

Paulo Tadeu Figueiredo
paulofigueiredo@unb.br

¹ Health Sciences Faculty, University of Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil

² Interdisciplinary Research Laboratory Applied to Clinical Practice in Oncology, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

³ Laboratory of Oral Histopathology, Health Sciences Faculty, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

Introduction

The osteonecrosis of the jaw (ONJ) has been primarily associated with bisphosphonates (BPs) since it was first reported by Marx [1] in 2003, and therefore described as bisphosphonate-related ONJ. However, since a causal relation of denosumab (DMAb) to ONJ was established, the nomenclature has been changing over the years, and the term “medication-related ONJ” is currently the most accepted [2–4]. BPs and DMAb are antiresorptive drugs, employed as treatment for osteoporosis, bone metastasis, and other diseases that weaken bone and make it susceptible to fractures [5–7].

Osteoclasts act in the bone remodeling process as they are responsible for bone resorption. Under normal circumstances, resorption is followed by mineral deposition. Such balance is fundamental to maintaining bone homeostasis, which is disrupted by diseases that aggravate bone resorption [8]. BPs and DMAb inhibit the activity of osteoclasts through different pharmacological mechanisms but result in a similar effect: a denser bone structure [8].

BPs are classified as non-nitrogenated or nitrogenated. Due to the higher effectiveness and poor metabolic breakdown of the nitrogenated forms, they are most frequently associated with ONJ [9, 10]. Zoledronate is an example of a nitrogenated bisphosphonate that is usually administered intravenously in patients with bone metastasis [9, 10]. It has high affinity for the hydroxyapatite on bone matrix and remains deposited in the bone tissue. When osteoclasts adhere to the bone surface to begin resorption, they release enzymes that acidify the environment and promote bone degradation. The bisphosphonate-loaded bone debris is phagocytized by the osteoclasts, and once inside the osteoclasts, BPs reduce cell activity or induce apoptosis [8].

DMAb is a human monoclonal antibody that has antiresorptive effects and mimics osteoprotegerin by binding to the receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) and inhibiting it. RANKL is a cytokine produced and released by osteoblasts to induce the differentiation of pre-osteoclasts into their active form. It binds to RANK, a receptor that is a member of the tumor necrosis factor (TNF) superfamily and expressed on the surface of pre-osteoclasts. Therefore, DMAb interferes with bone resorption by inhibiting osteoclastic differentiation, activation, and survival [8, 11]. Differently from the BPs, DMAb is not known to induce apoptosis nor to have any affinity for hydroxyapatite, refraining from attaching to the bone tissue [8, 12, 13]. Additionally, DMAb has a shorter half-life, which suggests that its effects are reversible [14].

The present systematic review aims to answer the following question: “Are bisphosphonate-related ONJ and denosumab-related ONJ any different, regarding clinical and imaging aspects?”. The hypothesis of this study is that BP-related ONJ and DMAb-related ONJ manifest clinical and

imaging characteristics that distinct one from another. Therefore, this systematic review has the objective of comparing the clinical presentation and imaging characteristics of BP-related ONJ and DMAb-related ONJ.

Methods

This systematic review was developed according to the Joanna Briggs Institute Review’s Manual [15] and reported according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) [16]. The protocol for this systematic review was submitted to the Open Science Framework (OSF), registration DOI 10.17605/OSF.IO/SFVP8, on August 7, 2020.

Eligibility criteria

For this systematic review, we included studies (observational and clinical trials) in which adult patients with BP- and DMAb-related ONJ were evaluated and clinical/imaging findings were compared.

Exclusion criteria comprised (1) reviews, letters, guidelines, personal opinions, book chapters, panels, editorials, conference abstracts, case reports, and case series; (2) studies that did not report any clinical or imaging characteristics of ONJ; (3) *in vitro* and *in vivo* studies; (4) studies that did not report characteristics of both BP- and DMAb-related ONJ; (5) studies that did not report the development of ONJ after therapy with either BPs or DMAb; (6) studies in which BP- and DMAb-related ONJ were not differentiated; (7) studies of unknown authors; (8) studies with no available full text; (9) and studies written in non-Latin alphabet.

Information source and search

The searches were performed on the following databases: PubMed, Cochrane, Scopus, Web of Science, and Lilacs. The full search strategy for each database is presented in [Electronic supplementary Material](#). Grey literature databases such as ProQuest, Open Grey, and Google Scholar were also searched. All databases were searched on March 18, 2019, and updated on January 20, 2020.

Study selection

In the first phase of study selection, titles and abstracts were assessed by two reviewers (RQ and NF), and a third reviewer (PTF) was involved in case of any disagreement. All studies that did not meet the selection criteria were identified and excluded.

In the second phase of study selection, the same inclusion and exclusion criteria were applied after the full text of the

articles was assessed. Again, the same two reviewers assessed the studies, and the third reviewer was involved whenever necessary. The excluded articles and the respective justifications are presented in [Electronic supplementary Material](#).

Data collection

Data on the authors, year of publication, country, type of study, objective, sample, intervention, conclusion, and outcomes were collected from included articles, and are presented in Table 1. Comparisons of clinical and imaging characteristics of BP- and DMAB-related ONJ were the main outcome. This comparison should comprehend clinical aspects such as staging, appearance, extension and location, and imaging aspects (in both conventional radiographs and CTs) such as the presence or absence of bone sequestra, bone sequestrum extension, and periosteal reaction.

One reviewer (RQ) collected all necessary information from selected articles. A second reviewer (NF) cross-checked the collected information. Any disagreements were discussed among authors, and other reviewers (PTF and AFL) were involved on a final decision whenever necessary.

Risk of bias

Risk of bias of individual studies was assessed with the Meta-Analysis of Statistics Assessment and Review Instrument (MAStARI), applied to each included study individually [15]. The risk of bias was deemed high if items classified as “yes” represented up to 49% of total items, moderate if items classified as “yes” were between 50 and 69%, and low if items classified as “yes” summed more than 70%. Risk of bias assessment is summarized in [Electronic supplementary Material](#).

Synthesis of results

A descriptive synthesis of the data was performed. Considering the heterogeneous nature of the expected outcomes and the objectives of this systematic review, a quantitative synthesis or meta-analysis was not expected.

Results

Study selection

The search on databases resulted in 7535 studies. After duplicates were removed, 5225 articles remained. In phase 1, titles and abstracts were analyzed, and 61 articles were included to phase 2. Additionally, one study was included from the grey literature databases.

After the 62 articles were fully read, 55 did not meet the selection criteria and were excluded in phase 2 ([Electronic supplementary Material](#)). In the end, seven articles fulfilled the inclusion criteria and were considered for this review. The flow chart in Fig. 1 illustrates the identification and selection process described here [24].

Study characteristics

The seven included studies were published between 2011 and 2019 and conducted in the following countries: the USA [17], Canada [18], Japan [19, 22], Germany [20, 21], and The Netherlands [23]. The total number of patients was 7755 (3925 under treatment with BPs, 3722 with DMAB, and 68 with both medications), as seen in Table 1.

Matsui et al. [22] evaluated 106 patients with bone metastasis, osteoporosis, rheumatism, and other diseases that were undergoing treatment with antiresorptive medications. They were divided into two groups: ONJ, comprised of patients that manifested the condition, and non-ONJ, comprised of patients who did not manifest the condition. A total of 23 patients with ONJ were identified. Nineteen patients presented BP-related ONJ: eight in stage 2; five in stage 0; four in stage 1; and two in stage 3. Out of three patients with DMAB-related ONJ, two were classified as stage 3 and one as stage 2. The authors did not describe the treatment protocol for one patient, who manifested ONJ in stage 1. Therefore, even though no statistically significant difference was reported by the authors, the majority of the BP-related ONJ patients were stage 2, while DMAB-related ONJ patients were mostly stage 3.

A randomized clinical trial [17] with 1597 patients evaluated the capacity of zoledronate and DMAB to delay the manifestation of skeletal-related events in advanced cancer patients. In this study, the authors did not observe a difference between BP- and DMAB-related ONJ in terms of clinical aspects, even though patients were not staged.

The incidence, risk factors, and outcomes of ONJ were assessed in a study by Saad et al. [18], who identified 89 patients with ONJ: 37 BP-related and 52 DMAB-related. These patients had bone metastasis and solid tumors or multiple myeloma. There was no significant difference in the cumulative incidence between the two groups.

Four studies described and compared the imaging aspects of BP- and DMAB-related ONJ [19–21, 23]. In an analysis of facial panoramic radiographs, Klingelhöffer et al. [21] identified the following imaging findings in the BP- and DMAB-treated patients: bone sequestra (only in BP-treated patients); bone sclerosis (both BP and DMAB); persistently visible alveolar socket (both); enhanced lamina dura (both); loss of lamina dura (both); enhanced mandibular canal (both); proliferative periostitis (both); and osteolytic process at the cortex (both). BP and DMAB groups were not statistically different,

Table 1 Descriptive characteristics of included articles ($n = 7$)

Study characteristics		Population characteristics			Intervention characteristics		Main results	
Author, year, and country	Type of study	Objective	Number of patients, sex, age (in years)	Underlying disease	Sample of interest	Intervention	Conclusion	Outcomes of interest
Henry et al., 2014 [17] The USA	RCT	Compare DMAB and Z regarding efficacy and safety as means to delay the manifestation of skeletal-related events in pts with solid tumors.	1597 pts F: 568 (MA: 59) M: 1029 (MA: 61)	Bone metastasis related to solid tumors, except for breast cancer	BP: 797 pts (F: 299, M: 498) DMAB: 800 pts (F: 269, M: 531)	Assessment of the time from baseline to the manifestation of the first SRE. BP: IV, Z: 4 mg DMAB: SC, 120 mg	DMAB injected monthly and subcutaneously was more efficient when compared to Z.	DMAB-related ONJ: 6 pts (0.8% of studied population) BP-related ONJ: 9 pts (1.1% of studied population) Incidence, characteristics, and resolution were similar when DMAB- and BP-related ONJ were compared.
Saad et al., 2011 [18] Canada	RCT	Define the incidence, risk factors, and treatment results of ONJ in risk pts that are under AT.	5723 pts (age: 18 or older) F: 2667 M: 3056	Breast cancer, prostate cancer, other solid tumors, and multiple myeloma	BP: 2861 pts DMAB: 2862 pts	Identification of signs and symptoms of ONJ, via visual examination of oral cavity, every 6 months, while pts remained enrolled in the study. Evaluation of systemic risk factors. Health-related quality of life (HRQoL). BP: IV, Z: 4 mg DMAB: SC, 120 mg 4 weeks	ONJ was not frequent. Treatment was predominantly conservative. Cicatrization occurred in more than one-third of pts.	DMAB-related ONJ: 52 pts Mandible: 34 pts (65.4%) Maxilla: 15 pts (28.8%) BP-related ONJ: 37 pts Mandible: 31 pts (83.8%) Maxilla: 5 pts (13.5%) Cumulative incidence of ONJ was not significantly different between two groups. ONJ occurred mostly in the mandible, independently of the medication.
Baba et al., 2018 [19] Japan	Cross-sectional	Investigate the imaging characteristics of ONJ obtained from CT scans and clarify the radiographic distinctions between BP-related ONJ and DMAB-related ONJ.	74 pts F: 60 M: 14 MA: 76.4	Osteoporosis, breast cancer, prostate cancer, multiple myeloma, rheumatoid arthritis, renal cancer, gastric cancer, colorectal cancer	BP: 64 pts DMAB: 10 pts	Evaluation of CT imaging characteristics of ONJ and of the differences between BP- and DMAB-related ONJ	Conventional CT may be considered a golden standard for evaluating the extension of the disease. The study was the first to compare imaging aspects of BP- and DMAB-related ONJ. New findings on imaging characteristics of ONJ were reported.	DMAB-related ONJ: 10 (13.5%). BP-related ONJ: 64 (86.5%). Larger bone sequestra and perosteal reactions were significantly more frequent in DMAB-related ONJ than in BP-related ONJ pts. No difference in the number of bone sequestra was noticed.
Heim et al., 2019 [20] Germany	Cross-sectional	Investigate and evaluate the changes in alveolar bone density of ONJ pts by analyzing CT scans of the mandible.	101 pts F: 49 M: 52 MA: 72.2 Age range: 41–91	Prostate cancer, breast cancer, lung cancer, osteoporosis, kidney cancer, cancer of unknown primary, multiple myeloma	BP: 35 pts DMAB: 26 pts Reference group: 40 pts	Analysis of the difference in jaw bone density between BP- and DMAB-related ONJ pts	BP changed the microarchitecture of the alveolar bone by depositing in the bone. Impaired vascularization could compromise the alveolar bone and make it more vulnerable to ONJ.	DMAB-related ONJ: 26 pts BP-related ONJ: 35 pts Jaw bone density was higher in BP-related ONJ pts than that in DMAB-related ONJ pts.

Table 1 (continued)

Study characteristics		Population characteristics		Intervention characteristics		Main results	
Author, year, and country	Type of study	Objective	Number of patients, sex, age (in years)	Underlying disease	Sample of interest	Intervention	Outcomes of interest
Klingelhofer et al., 2016 [21] Germany	Cross-sectional	Identify the correlation between radiographic aspects and risk of BP-related ONJ and DMAB-related ONJ.	120 pts Genre: - MA: 67.6 (experimental group) 63.7 (control group)	No information	BP: 51 pts DMAB: 2 pts BP and DMAB: 7	Evaluation of panoramic radiographs of pts undergoing AT who manifested ONJ or not	The radiographs of AT pts who manifested ONJ registered frequent alterations on the bone structure DMAB-related ONJ: 6 pts BP-related ONJ: 26 pts Enhancement of mandibular canal was more evident in the DMAB group
Matsui et al., 2015 [22] Japan	Cross-sectional	Retrospectively evaluate the clinical treatment results and prognosis in ONJ pts, classified according to the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons.	106 pts (1 pt had ONJ, but the medication was not known) F: 88 M: 18 MA: 74.8 (ONJ) and 72.1 (non-ONJ)	Osteoporosis, breast cancer, lung cancer, stomach cancer, fracture, rheumatism, and unknown condition	BP: 83 pts without ONJ and 17 pts with ONJ DMAB: 5 pts with ONJ	Retrospective review of characteristics of characteristics and treatment results of 106 pts admitted to a reference hospital between 2012 and 2014. Multiple logistic regression analysis was performed to evaluate correlation between clinical variables and disease progression	Out of the pts who did not have ONJ and who required dental treatment, 1 pt manifested BP-related ONJ after treatment. DMAB-related ONJ: 5 pts (21.8%) BP-related ONJ: 17 pts (73.9%) Most of the BP-related ONJ pts were stage 2, while DMAB-related ONJ pts were mostly stage 3. The cases occurred mostly in the mandible (65.2%).
Pichardo et al., 2019 [23] The Netherlands	Cross-sectional	Compare the radiographic abnormalities between BP-related ONJ and DMAB-related ONJ pts via CBCT.	34 pts F: 21 pts M: 13 pts MA: 69	Osteoporosis, breast cancer, prostate cancer, lung cancer	BP: 17 pts DMAB: 17 pts	Comparison via CBCT of the bone abnormalities existing in DMAB- and BP-related ONJ pts	DMAB-related ONJ may present clinical and radiological features that differ from BP-related ONJ. DMAB-related ONJ: 17 pts BP-related ONJ: 17 pts Sequestra and cortical bone destruction are significantly less common in the DMAB group than in the BP group. No significant difference in the severity of ONJ between BPs and DMAB groups.

RCT randomized clinical trial, DMAB denosumab, Z zoledronate, pt(s) patient(s), F female, M male, MA median age, BP bisphosphonates, SRE skeletal-related events, IV intravenous, SC subcutaneous, DMAB-related ONJ denosumab-related osteonecrosis of the jaw, BP-related ONJ bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw, AT antiresorptive therapy, CT computed tomography, ONJ osteonecrosis of the jaw, CBCT cone beam computed tomography

except for the enhancement of mandibular canal, which was more evident in the DMAB-treated patients ($p = 0.047$).

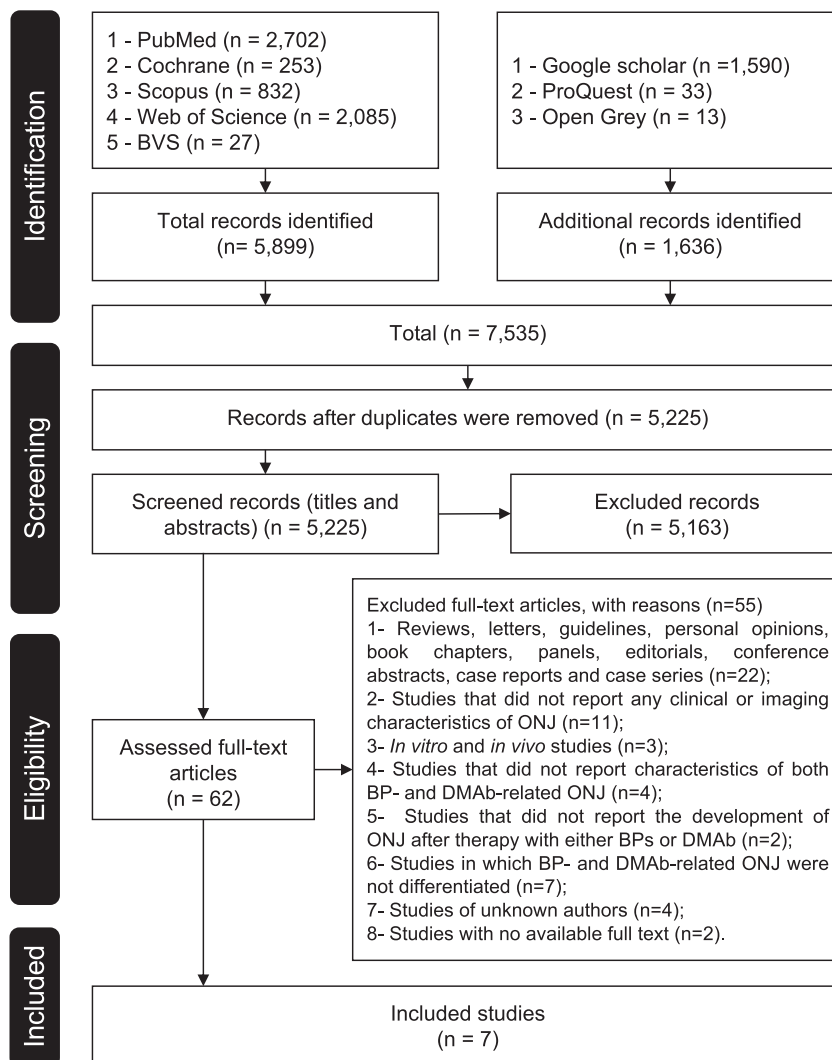
Baba et al. [19] investigated ONJ via computed tomography (CT) scans, aiming to determine the radiographic differences between BP- and DMAB-related ONJ. Seventy-four patients with ONJ were evaluated: 64 BP-related and 10 DMAB-related. Aspects such as location of the lesion, internal bone texture, presence of sequestrum, sequestrum extension, periosteal reaction, cortical perforation, bone expansion, and pathologic fracture were assessed. The authors observed that large bone sequestra and periosteal reactions were significantly more frequent in DMAB-related ONJ than in BP-related ONJ patients ($p < 0.05$), even though no difference in the number of sequestra was found.

Heim et al. [20] assessed the density of the mandibular alveolar bone counterlateral to the necrosis in patients with BP- and DMAB-related ONJ via CT scans, and compared them to a reference group of non-treated patients. Mandible

cancellous bone was evaluated in two different sites: the region anterior to the mental foramen and the retromolar region. Higher bone density values were observed in the BP-related ONJ group, compared to both DMAB-related ONJ ($p = 0.049$) and control ($p = 0.023$) groups. This difference was only significant in the region anterior to the mental foramen. No significant difference was noted between DMAB-related ONJ and control groups.

Pichardo et al. [23] compared the frequency of the imaging findings after analyzing cone beam CT scans of BP- and DMAB-related ONJ patients. They reported that bone sequestra and the lysis of the cortical border of the jaw were significantly less frequent in DMAB-related ONJ than those in BP-related ONJ patients ($p = 0.015$ and $p = 0.033$, respectively). The authors did not observe any significant difference in severity between the BP- and DMAB-related ONJ groups ($p = 0.169$) whenever staging was considered. They also report that the median duration of antiresorptive therapy before the onset of ONJ was 18 months (range: 8–48 months) in the DMAB

Fig. 1 Flow chart of literature search and selection of studies, adapted from PRISMA [24]. From 5225 articles (after duplicates were removed), 62 were screened in phase 1 of study selection (after assessment of titles and abstracts) and 7 were included in phase 2 (after reading of complete article)



group, while in the BPs group, the median was 42 months (range: 18–120 months).

All seven studies presented a low or moderate risk of bias. Cross-sectional studies resulted in a risk of bias of 55.5%, 77.7%, 75%, 100%, and 66.6%, respectively [19–23]. Randomized clinical trials resulted in a risk of bias of 80% and 66.6%, respectively [17, 18].

Synthesis of results

The present systematic review identified seven studies that fulfilled the inclusion criteria and compared the clinical or imaging aspects of BP- and DMAB-related ONJ. The results of these studies are summarized in Fig. 2.

Even though BPs and DMAB act through different pharmacological mechanisms, three studies reported that the drugs resulted in ONJ with similar clinical characteristics [17, 18, 23]. Even though one study [22] reported that patients treated with BPs presented better clinical condition, this observation was not statistically significant.

In four studies [19–21, 23], statistically significant differences between BP- and DMAB-related ONJ were observed in imaging aspects. Heim et al. [20] and Pichardo et al. [23] identified an increase in bone sequestra, cortical bone lysis, and bone density in BP-related ONJ, while Baba et al. [19] and Klingelhöffer [21] noted larger bone sequestra, more frequent periosteal reactions, and mandibular canal enhancement

in DMAB-related ONJ. Out of the studies that assessed imaging characteristics, three analyzed CT scans [19, 20, 23].

Considering the risk of bias in each of the included studies, their findings support the notion that BP-related ONJ and DMAB-related ONJ are clinically similar, but radiographically distinct. BP-related ONJ and DMAB-related ONJ manifest imaging aspects that are significantly more frequent in one condition than in the other, as depicted in Fig. 2.

Discussion

To our knowledge, this systematic review is the first to show that ONJ manifests a set of imaging aspects differently depending on the causal antiresorptive drug, either BPs or DMAB. It corroborates and answers a question proposed by Pichardo et al. [25]: is DMAB-related osteonecrosis a new entity? The results presented in this systematic review confirm the difference between BP- and DMAB-related ONJ regarding the frequency and extension of their radiographic characteristics. However, it is worth noting that BP- and DMAB-related ONJ might share clinical and imaging aspects, since no characteristic that is exclusive to BP- or DMAB-related ONJ was identified.

A number of clinical criteria should be considered for the diagnosis of ONJ: a history of previous or ongoing use of antiresorptive or antiangiogenic drugs; bone exposure in the

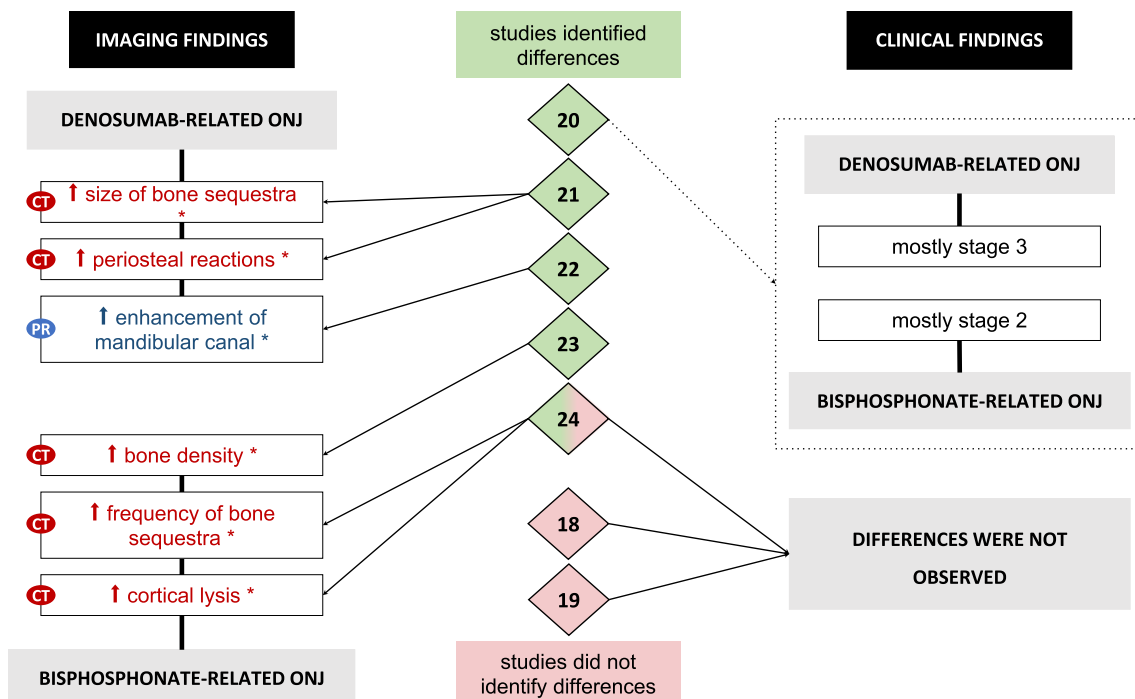


Fig. 2 Summary of results. The main results of each included study (depicted in the middle as their reference numbers inside the diamonds) are presented. Differences between bisphosphonate- and denosumab-related osteonecrosis of the jaws are summarized according to imaging

or clinical findings. ONJ, osteonecrosis of the jaw; CT, findings observed in computed tomography exams; PR, findings observed in panoramic radiographs. Asterisks indicate statistical significance was observed in the study— $p < 0.05$

oral cavity; presence of intra- or extraoral fistulae that trace back to the adjacent bone and last longer than 8 weeks; and no history of previous radiotherapy or metastasis in the maxillofacial region [4]. ONJ is staged from 0 to 3; each stage is characterized by varying degrees of bone exposure, pain, and infection [4]. No evidence of BPs and DMAB causing distinct clinical manifestations of ONJ was observed in the included studies, and any possible differences in terms of clinical staging were not statistically verified.

Despite the lack of reports in the literature, there is enough evidence to define differences in imaging aspects between BP- and DMAB-related ONJ. Limones et al. [26] suggest in their analysis of incidence, relative risk, and prognosis that DMAB has a higher risk of inducing ONJ. This analogically corroborates the differences observed in our systematic review, particularly the presence of larger bone sequestra, more intense periosteal reactions, and increased mandibular canal enhancement in DMAB-treated patients. Despite these findings, the increase in bone sequestra, cortical bone lysis, and bone density in BP-treated patients is also noteworthy.

Four of the included studies reported differences in imaging findings between BP- and DMAB-related ONJ [19–21, 23], even though they point to a divergent direction as to which is the most severe condition. Baba et al. [19] and Klingelhöffer [21] reported DMAB-related ONJ as more aggressive, while Heim et al. [20] and Pichardo et al. [23] pointed that BP-related ONJ is the most severe. Nevertheless, each of those authors described differences in their image analyses that were distinctively associated with either BP- or DMAB-related ONJ.

It is important to note that out of those studies, one [21] compared the two conditions by assessing panoramic radiographs, while the other three [19, 20, 23] analyzed CT scans. Although both techniques are appropriate for observing imaging characteristics of ONJ, CT scans generate tridimensional images, yield more accurate information, and allow for the detection of early signs of lesions [27, 28]. Therefore, CT scans are indicated for a more precise diagnosis. Unlike conventional radiographs, CT does not underestimate the extension of lesions nor the presence of small bone sequestra [29]. Treister et al. [28] report that cone beam CT scans result in better quality images and enable the recognition of more imaging characteristics when compared to conventional radiographs. Alterations of bone mineralization are considerably more noticeable in CT scans, which aids in the early identification of areas prone to formation of bone sequestra, focal sclerotic lesions, thickening of lamina dura, and periosteal reaction [27]. Although some findings that are observed on CT scans might not be commonly detected on conventional radiographs, and despite early signs of ONJ being undetectable on conventional radiographs, these exams help predict areas where osteonecrosis may develop, as they support the

identification of diffuse or localized osteosclerosis and thickening of lamina dura [4]. Conventional radiographs, such as panoramic radiographs, remain important in this context, since they are widely used as routine control of ONJ development, whereas CT scans are used for a more precise diagnosis and a refined understanding of ONJ extension. These differences in intrinsic properties and features of each radiographic technique should be considered while assessing imaging characteristics of BP- and DMAB-related ONJ.

Limitations regarding the heterogeneity among the included studies were observed. In only two studies [17, 18], the underlying diseases were exclusively malignant conditions. In the other studies [19–23], the underlying disease was either malignant, osteoporosis, or rheumatoid arthritis. In these cases, the route of administration, dosage, and length of treatment varied according to the patients' underlying disease. The risk of medication-related ONJ is 100 times lower in patients with non-malignant conditions, such as osteoporosis and rheumatoid arthritis, than those in patients with malignant diseases [2]. Malignant conditions frequently demand a more intense therapeutic protocol. Although uncommon, ONJ may manifest in patients with non-malignant conditions undergoing oral antiresorptive therapy. These patients are usually exposed to low doses and for a short period of time, unlike patients with malignant conditions, who require higher doses, via intravenous or subcutaneous administration, and for a longer period of time. Therefore, the underlying disease should be considered when selecting or grouping patients for the analysis of medication-related ONJ.

Another limitation concerns the lack of information on the dosage of BPs or DMAB that was administered to patients, which was described in only three studies [17, 18, 23], as well as of data on incidence, described in four studies [19–22]. In two studies [17, 18], patients underwent similar treatment protocols, based on zoledronic acid at 4 mg or DMAB at 120 mg every 4 weeks. In both studies, there was no significant difference in the incidence of ONJ between BPs and DMAB groups observed. Pichardo et al. [23] reported that patients were treated with different brands of DMAB or different BPs at varying doses. In spite of such variability, previous randomized clinical trials show that therapeutic protocols of either BPs or DMAB in doses similar to the ones used in the aforementioned studies do not result in a different incidence of ONJ [30–32].

We highlight the need of more homogeneous studies so that a comprehensive analysis is feasible. The number of patients treated with DMAB was noticeably fewer when compared to patients treated with BPs. In some of the included studies, the comparison between BP- and DMAB-related ONJ was only a secondary observation, even among randomized clinical trials [17, 18, 21, 22]. Studies that compare characteristics of BP- and DMAB-related ONJ are fairly recent. This is because osteonecrosis induced by medication is itself a recent

condition and has been gradually becoming a subject of interest for researchers.

Further studies are also advised to confirm if the time between baseline—the first use of the antiresorptive drug—and the manifestation of ONJ is shorter in patients treated with DMAB than those in patients treated with BPs, as suggested in the literature [33, 34].

Due to the fact the BPs- and DMAB-related ONJ are distinct conditions, as demonstrated in this systematic review, we emphasize the importance of the medical history and a well-conducted anamnesis for the proper diagnostic process.

Conclusion

This systematic review verified that BP- and DMAB-related ONJ are distinct conditions. It confirms the hypothesis that the different mechanisms of action of these drugs result in different manifestations. This is highlighted by the differences in imaging aspects of BP- and DMAB-related ONJ. We stress the need for methodologically homogeneous studies that compare characteristics of BP- and DMAB-related ONJ in different types of imaging examinations, considering that conventional radiographs are the most used exam for routine follow-up, and CT scans are mostly used for a more accurate diagnosis of ONJ and its extension. We also recommend studies that analyze the influence of individual predisposition on the development of the diseases.

Acknowledgments The authors would like to thank Margaret Durdan (University of Michigan) for proofreading this manuscript.

Authors' contributions • Idea for the article: NM, RQ, PTF, and AFL
 • Literature search: RQ
 • Data analysis: RQ, NF, and PTF
 • Drafted the work: RQ, NM, GAB, PTF, and AFL
 • Critically revised the work: RQ, NM, CRMM, CMS, PEDR, GAB, AFL, and PTF

Funding RQS was funded (by means of a scholarship) by CAPES—Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Marx RE (2003) Pamidronate (AREDIA) and zoledronate (ZOMETA) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 61:1115–1118
- Ruggiero SL, Dodson DB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B et al (2014) American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw—2014 Update. *J Oral Maxillofac Surg* 42:1938–1956
- Hamadeh IS, Ngwa BA, Gong Y (2015) Drug induced osteonecrosis of the jaw. *Cancer Treat Rev* 41:455–464
- Ruggiero SL (2015) Diagnosis and staging of medication-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 27:479–487
- Cummings SR, San Martin J, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR et al (2009) Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 36:756–765
- Fizazi K, Carducci M, Smith M, Damião R, Brown J, Karsh L, Milecki P, Shore N, Rader M, Wang H, Jiang Q, Tadros S, Dansey R, Goessl C (2011) Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. *Lancet*. 377:813–822
- Russell RG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ (2008) Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int* 19:733–759
- Baron R, Ferrari S, Russell RG (2011) Denosumab and bisphosphonates: different mechanisms of action and effects. *Bone*. 48:677–692
- Rosella D, Papi P, Giardino R (2016) Medication-related osteonecrosis of the jaw: clinical and practical guidelines. *J Int Soc Prev Community Dent* 6:97–104
- Frith JC, Monkkonen J, Blackburn GM, Russell RG, Rogers MJ (1997) Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5''-(beta,gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. *J Bone Miner Res* 12:1358–1367
- Delmas PD (2008) Clinical potential of RANKL inhibition for the management of postmenopausal osteoporosis and other metabolic bone diseases. *J Clin Densitom* 11:325–338
- Charopoulos I, Orme S, Giannoudis PV (2011) The role and efficacy of denosumab in the treatment of osteoporosis: an update. *Expert Opin Drug Saf* 10:205–217
- de Castro J, Garcia R, Garido P (2015) Therapeutic potential of denosumab in patients with lung cancer: beyond prevention of skeletal complications. *Clin Lung Cancer* 16:431–446
- Bekker PJ, Holloway DL, Rasmussen AS, Murphy R, Martin SW, Leese PT, Holmes GB, Dunstan CR, DePaoli AM (2005) A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. 2004. *J Bone Miner Res* 12:2275–2282
- Institute TJB (2014) Joanna Briggs Institute Reviewers' Manual: 2014 Edition. Joanna Briggs Institute, Adelaide [Internet]. [cited Jul 18 2019]. Available from: <http://joannabriggs.org/assets/docs/sumari/ReviewersManual-2014.pdf>
- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009) Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med* 6(7):e1000097. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed1000097>
- Henry D, Vadhan-Raj S, Hirsh V, von Moos R, Hungria V, Costa L, Woll PJ, Scagliotti G, Smith G, Feng A, Jun S, Dansey R, Yeh H (2014) Delaying skeletal-related events in a randomized phase 3 study of denosumab versus zoledronic acid in patients with advanced cancer: a analysis of data from patients with solid tumors. *Support Care Cancer* 22:679–687
- Saad F, Brown JE, Van Poznak C, Ibrahim T, Stemmer SM, Stopeck AT et al (2012) Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. *Ann Oncol* 23:1341–1347

19. Baba A, Goto TK, Ojiri H, Takagiwa M, Hiraga C, Okamura M et al (2018) CT imaging features of antiresorptive agent-related osteonecrosis of the jaw/medication-related osteonecrosis of the jaw. *Dentomaxillofac Radiol* 47:20170323
20. Heim N, Götz W, Kramer FJ, Faron A (2019) Antiresorptive drug-related changes of the mandibular bone density in medication-related osteonecrosis of the jaw patients. *Dentomaxillofac Radiol* 48:20190132
21. Klingelhoffer C, Klingelhoffer M, Müller S, Ettl T, Wahlmann U (2016) Can dental panoramic radiographic findings serve as indicators for the development of medication-related osteonecrosis of the jaw? *Dentomaxillofac Radiol* 45:1–7
22. Matsui A, Kurihara J, Morishima H, Suzuki H, Sato S, Yamauchi K, Takahashi T (2015) Medication related osteonecrosis of the jaw (MRONJ): a retrospective survey of a series of patients treated according to the AAOMS guidelines. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol* 27:757–763
23. Pichardo SEC, Broek FWT, Fiocco M, Appelman-Dijkstra NM, van Merkesteyn JPR (2019) A comparison of the cone beam computed tomography (CBCT) findings in medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ) related to denosumab vs. bisphosphonates: an observational pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 19:31496–31498
24. Moher D, Shamseer L, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, PRISMA-P Group et al (2015) Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Syst Rev* 4:1–9
25. Pichardo SE, Kuypers SC, van Merkesteyn JP (2013) Denosumab osteonecrosis of the mandible: a new entity? A case report. *J Cranio-Maxillofac Surg* 41:65–69
26. Limones A, Sáez-Alcaide LM, Díaz-Parreño SA, Helm A, Bornstein MM, Molinero-Mourelle P (2020) Medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ) in cancer patients treated with denosumab vs. zoledronic acid: a systematic review and meta-analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 3:326–336
27. Bianchi SD, Scoletta M, Cassione FB, Migliaretti G, Mozzati M (2007) Computerized tomographic findings in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw in patients with cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 104:249–258
28. Treister NS, Friedland B, Woo SB (2010) Use of cone-beam computerized tomography for evaluation of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 109:753–764
29. Arce K, Assael LA, Weissman JL, Markiewicz MR (2009) Imaging findings in bisphosphonate-related osteonecrosis of jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 67:75–84
30. Stopeck AT, Lipton A, Body JJ, Steger GG, Tonkin K, Boer RH et al (2010) Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study. *J Clin Oncol* 28:5132–5139
31. Raje N, Terpos E, Willenbacher W, Shimizu K, García-Sanz R, Durie B, Legieć W, Krejčí M, Laribi K, Zhu L, Cheng P, Warner D, Roodman GD (2018) Denosumab versus zoledronic acid in bone disease treatment of newly diagnosed multiple myeloma: an international, double-blind, double-dummy, randomised, controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol* 19:370–381
32. Scagliotti GV, Hirsh V, Siena S, Henry DH, Woll PJ, Manegold C, Solal-Celigny P, Rodriguez G, Krzakowski M, Mehta ND, Lipton L, García-Sáenz JA, Pereira JR, Prabhaskar K, Ciuleanu TE, Kanarev V, Wang H, Balakumaran A, Jacobs I (2012) Overall survival improvement in patients with lung cancer and bone metastases treated with denosumab versus zoledronic acid subgroup analysis from a randomized phase 3 study. *J Thorac Oncol* 7:1823–1829
33. Diz P, Lopez-Cedrun JL, Arenaz J, Scully C (2012) Denosumab-related osteonecrosis of the jaw. *J Am Dent Assoc* 143:981–984
34. Poubel VLDN, Silva CAB, Mezzomo LAM, De Luca Canto G, Rivero ERC (2018) The risk of osteonecrosis on alveolar healing after tooth extraction and systemic administration of antiresorptive drugs in rodents: a systematic review. *J Craniomaxillofac Surg* 46:245–256

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

11 CONCLUSÃO

8.2.1 As alterações imaginológicas ocorrem precocemente no osso mandibular em modelo animal de osteonecrose por uso de medicamentos da classe dos bisfosfonatos. Alterações clínicas foram observadas tardiamente, após extração dentária.

8.2.2 Apesar da semelhança clínica, os aspectos imaginológicos da osteonecrose causada por bisfosfonatos e denosumabe não são similares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014;72(10):1938-56.
2. 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.
3. Aghaloo TL, Felsenfeld AL, Tetradis S. Osteonecrosis of the jaw in a patient on Denosumab. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(5):959-63.
4. Cummings SR, San Martin J, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, et al. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med.* 2009;361(8):756-65.
5. Fizazi K, Carducci M, Smith M, Damião R, Brown J, Karsh L, et al. Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. *Lancet.* 2011;377(9768):813-22.
6. Russell RG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int.* 2008;19(6):733-59.
7. Baron R, Ferrari S, Russell RG. Denosumab and bisphosphonates: different mechanisms of action and effects. *Bone.* 2011;48(4):677-92.
8. Henry D, Vadhan-Raj S, Hirsh V, von Moos R, Hungria V, Costa L, et al. Delaying skeletal-related events in a randomized phase 3 study of denosumab versus zoledronic acid in patients with advanced cancer: an analysis of data from patients with solid tumors. *Support Care Cancer.* 2014;22(3):679-87.
9. Junquera L, Gallego L. Nonexposed bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: another clinical variant? *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66(7):1516-7.
10. Fedele S, Porter SR, D'Aiuto F, Aljohani S, Vescovi P, Manfredi M, et al. Nonexposed variant of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a case series. *Am J Med.* 2010;123(11):1060-4.

11. Baba A, Goto TK, Ojiri H, Takagiwa M, Hiraga C, Okamura M, et al. CT imaging features of antiresorptive agent-related osteonecrosis of the jaw/medication-related osteonecrosis of the jaw. *Dentomaxillofac Radiol.* 2018;47(4):20170323.
12. 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(9):2232-40.
13. Chang J, Hakam AE, McCauley LK. Current Understanding of the Pathophysiology of Osteonecrosis of the Jaw. *Curr Osteoporos Rep.* 2018;16(5):584-95.
14. Patel S, Choyee S, Uyanne J, Nguyen AL, Lee P, Sedghizadeh PP, et al. Non-exposed bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a critical assessment of current definition, staging, and treatment guidelines. *Oral Dis.* 2012;18(7):625-32.
15. Khan AA, Morrison A, Hanley DA, Felsenberg D, McCauley LK, O'Ryan F, et al. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. *J Bone Miner Res.* 2015;30(1):3-23.
16. Limones A, Sáez-Alcaide LM, Díaz-Parreño SA, Helm A, Bornstein MM, Molinero-Mourelle P. Medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ) in cancer patients treated with denosumab VS. zoledronic acid: A systematic review and meta-analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2020;25(3):e326-e36.
17. Hallmer F, Bjarnadottir O, Götrick B, Malmström P, Andersson G. Incidence of and risk factors for medication-related osteonecrosis of the jaw in women with breast cancer with bone metastasis: a population-based study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2020;130(3):252-7.
18. Srivastava A, Nogueras Gonzalez GM, Geng Y, Won AM, Cabanillas ME, Naing A, et al. Prevalence of medication related osteonecrosis of the jaw in patients treated with sequential antiresorptive drugs: systematic review and meta-analysis. *Support Care Cancer.* 2020.
19. Rosella D, Papi P, Giardino R, Cicalini E, Piccoli L, Pompa G. Medication-related osteonecrosis of the jaw: Clinical and practical guidelines. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2016;6(2):97-104.
20. Frith JC, Mönkkönen J, Blackburn GM, Russell RG, Rogers MJ. Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta, gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. *J Bone Miner Res.* 1997;12(9):1358-67.

21. Delmas PD. Clinical potential of RANKL inhibition for the management of postmenopausal osteoporosis and other metabolic bone diseases. *J Clin Densitom.* 2008;11(2):325-38.
22. Charopoulos I, Orme S, Giannoudis PV. The role and efficacy of denosumab in the treatment of osteoporosis: an update. *Expert Opin Drug Saf.* 2011;10(2):205-17.
23. De Castro J, García R, Garrido P, Isla D, Massuti B, Blanca B, et al. Therapeutic Potential of Denosumab in Patients With Lung Cancer: Beyond Prevention of Skeletal Complications. *Clin Lung Cancer.* 2015;16(6):431-46.
24. Bekker PJ, Holloway DL, Rasmussen AS, Murphy R, Martin SW, Leese PT, et al. A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. 2004. *J Bone Miner Res.* 2005;20(12):2275-82.
25. Fliefel R, Troltzsch M, Kuhnisch J, Ehrenfeld M, Otto S. Treatment strategies and outcomes of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) with characterization of patients: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015;44(5):568-85.
26. Soutome S, Hayashida S, Funahara M, Sakamoto Y, Kojima Y, Yanamoto S, et al. Factors affecting development of medication-related osteonecrosis of the jaw in cancer patients receiving high-dose bisphosphonate or denosumab therapy: Is tooth extraction a risk factor? *PLoS One.* 2018;13(7):e0201343.
27. Soundia A, Hadaya D, Esfandi N, de Molon RS, Bezouglaia O, Dry SM, et al. Osteonecrosis of the jaws (ONJ) in mice after extraction of teeth with periradicular disease. *Bone.* 2016;90:133-41.
28. 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.
29. Kajizono M, Sada H, Sugiura Y, Soga Y, Kitamura Y, Matsuoka J, et al. Incidence and Risk Factors of Osteonecrosis of the Jaw in Advanced Cancer Patients after Treatment with Zoledronic Acid or Denosumab: A Retrospective Cohort Study. *Biol Pharm Bull.* 2015;38(12):1850-5.
30. Ueda N, Nakashima C, Aoki K, Shimotsuji H, Nakaue K, Yoshioka H, et al. Does inflammatory dental disease affect the development of medication-related osteonecrosis of the jaw in patients using high-dose bone-modifying agents? *Clin Oral Investig.* 2020.

31. McGowan K, McGowan T, Ivanovski S. Risk factors for medication-related osteonecrosis of the jaws: A systematic review. *Oral Dis.* 2018;24(4):527-36.
32. Fedele S, Bedogni G, Scoletta M, Favia G, Colella G, Agrillo A, et al. Up to a quarter of patients with osteonecrosis of the jaw associated with antiresorptive agents remain undiagnosed. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2015;53(1):13-7.
33. Gaêta-Araujo H, Vanderhaeghen O, Vasconcelos KF, Coucke W, Coropciuc R, Politis C, et al. Osteomyelitis, osteoradionecrosis, or medication-related osteonecrosis of the jaws? Can CBCT enhance radiographic diagnosis? *Oral Dis.* 2021;27(2):312-9.
34. Shin JW, Kim JE, Huh KH, Yi WJ, Heo MS, Lee SS, et al. Computed tomography imaging features of osteomyelitis of the jaw: comparison between antiresorptive medication-related conditions and medication-unrelated conditions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2020;129(6):629-34.
35. Moreno-Rabié C, Gaêta-Araujo H, Oliveira-Santos C, Politis C, Jacobs R. Early imaging signs of the use of antiresorptive medication and MRONJ: a systematic review. *Clin Oral Investig.* 2020;24(9):2973-89.
36. Hamada H, Matsuo A, Koizumi T, Satomi T, Chikazu D. A simple evaluation method for early detection of bisphosphonate-related osteonecrosis of the mandible using computed tomography. *J Craniomaxillofac Surg.* 2014;42(6):924-9.
37. Eguchi T, Kanai I, Basugi A, Miyata Y, Inoue M, Hamada Y. The assessment of surgical and non-surgical treatment of stage II medication-related osteonecrosis of the jaw. *Med oral patol oral cir bucal (Internet).* 2017;22(6):e788-e95.
38. Pichardo SEC, Broek FWT, Fiocco M, Appelman-Dijkstra NM, van Merkesteyn JPR. A comparison of the cone beam computed tomography findings in medication-related osteonecrosis of the jaws related to denosumab versus bisphosphonates: an observational pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2020;129(4):411-7.
39. Kuroshima S, Sasaki M, Murata H, Sawase T. Medication-related osteonecrosis of the jaw-like lesions in rodents: A comprehensive systematic review and meta-analysis. *Gerodontology.* 2019;36(4):313-24.
40. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Group P. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med.* 2009;6(7):e1000097.

41. Aapro M, Abrahamsson PA, Body JJ, Coleman RE, Colomer R, Costa L, et al. Guidance on the use of bisphosphonates in solid tumours: Recommendations of an international expert panel. *Annals of Oncology*. 2008;19(3):420-32.
42. Moher D, Shamseer L, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Syst Rev*. 2015;4:1.
43. Saad F, Brown JE, Van Poznak C, Ibrahim T, Stemmer SM, Stopeck AT, et al. Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. *Ann Oncol*. 2012;23(5):1341-7.
44. Matsui A, Kurihara J, Morishima H, Suzuki H, Sato S, Yamauchi K, et al. Medication related osteonecrosis of the jaw (MRONJ): A retrospective survey of a series of patients treated according to the AAOMS guidelines. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery Medicine and Pathology*. 2015;27(6):757-63.
45. Heim N, Götz W, Kramer FJ, Faron A. Antiresorptive drug-related changes of the mandibular bone density in medication-related osteonecrosis of the jaw patients. *Dentomaxillofac Radiol*. 2019;48(8):20190132.
46. Klingelhofer C, Klingelhofer M, Muller S, Ettl T, Wahlmann U. Can dental panoramic radiographic findings serve as indicators for the development of medication-related osteonecrosis of the jaw? *Dentomaxillofac Radiol*. 2016;45(5):20160065.
47. Saad F, Brown JE, Van Poznak C, Ibrahim T, Stemmer SM, Stopeck AT, et al. Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. *Ann Oncol*. 2012;23(5):1341-7.
48. Junquera L, Pelaz A, Gallego L, Garcia-Consuegra L, Costilla S. Bisphosphonate-Related Osteonecrosis Associated With Dental Implants: A MicroComputed Tomography Study. *Implant Dentistry*. 2014;23(3):258-63.
49. de Molon RS, Shimamoto H, Bezouglaia O, Pirih FQ, Dry SM, Kostenuik P, et al. OPG-Fc but Not Zoledronic Acid Discontinuation Reverses Osteonecrosis of the Jaws (ONJ) in Mice. *J Bone Miner Res*. 2015;30(9):1627-40.
50. 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):815-25.

51. Taniguchi T, Arijii Y, Nozawa M, Naitoh M, Kuroiwa Y, Kurita K, et al. Computed tomographic assessment of early changes of the mandible in bisphosphonate-treated patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2016;122(3):362-72.
52. Tohashi K, Nakabayashi M, Kodani I, Kidani K, Ryoke K. Associations between Systemic Markers of Bone Turnover or Bone Mineral Density and Anti-Resorptive Agent-Related Osteonecrosis of the Jaw in Patients Treated with Anti-Resorptive Agents. *Yonago Acta Med*. 2016;59(1):45-53.
53. Vermeer JA, Renders GA, Everts V. Osteonecrosis of the Jaw-a Bone Site-Specific Effect of Bisphosphonates. *Curr Osteoporos Rep*. 2016;14(5):219-25.
54. Liu J, Liu SY, Zhao YJ, Gu X, Li Q, Jin ZL, et al. Effects of occlusion on mandibular morphology and architecture in rats. *J Surg Res*. 2016;200(2):533-43.
55. Matsumoto MA, de Abreu Furquim EM, Gonçalves A, Santiago-Júnior JF, Saraiva PP, Cardoso CL, et al. Aged rats under zoledronic acid therapy and oral surgery. *J Craniomaxillofac Surg*. 2017;45(5):781-7.
56. Klingelhofer C, Zeman F, Meier J, Reichert TE, Ettl T. Evaluation of surgical outcome and influencing risk factors in patients with medication-related osteonecrosis of the jaws. *J Craniomaxillofac Surg*. 2016;44(10):1694-9.
57. 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):249-58.
58. Treister NS, Friedland B, Woo SB. Use of cone-beam computerized tomography for evaluation of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;109(5):753-64.
59. Arce K, Assael LA, Weissman JL, Markiewicz MR. Imaging findings in bisphosphonate-related osteonecrosis of jaws. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67(5 Suppl):75-84.
60. Stopeck AT, Lipton A, Body JJ, Steger GG, Tonkin K, de Boer RH, et al. Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study. *J Clin Oncol*. 2010;28(35):5132-9.
61. Raje N, Terpos E, Willenbacher W, Shimizu K, García-Sanz R, Durie B, et al. Denosumab versus zoledronic acid in bone disease treatment of newly diagnosed

multiple myeloma: an international, double-blind, double-dummy, randomised, controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2018;19(3):370-81.

62. Scagliotti GV, Hirsh V, Siena S, Henry DH, Woll PJ, Manegold C, et al. Overall survival improvement in patients with lung cancer and bone metastases treated with denosumab versus zoledronic acid: subgroup analysis from a randomized phase 3 study. *J Thorac Oncol.* 2012;7(12):1823-9.

63. Pichardo SE, Kuypers SC, van Merkesteyn JP. Denosumab osteonecrosis of the mandible: a new entity? A case report. *J Craniomaxillofac Surg.* 2013;41(4):e65-9.

64. Diz P, Lopez-Cedrun JL, Arenaz J, Scully C. Denosumab-related osteonecrosis of the jaw. *J Am Dent Assoc.* 2012;143(9):981-4.

65. Poubel V, Silva CAB, Mezzomo LAM, De Luca Canto G, Rivero ERC. The risk of osteonecrosis on alveolar healing after tooth extraction and systemic administration of antiresorptive drugs in rodents: a systematic review. *J Craniomaxillofac Surg.* 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – ESTRATÉGIAS DE BUSCA

Base de dados	Busca 20-01-20	Referências
PubMed	<p>"Osteonecrosis"[Mesh] OR "Osteonecrosis/diagnostic imaging"[Mesh] OR "Osteonecrosis/drug therapy"[Mesh] OR "Osteonecrosis/epidemiology"[Mesh] OR "Osteonecrosis/etiology"[Mesh] OR "Osteonecrosis/metabolism"[Mesh] OR "Osteonecrosis/microbiology"[Mesh] OR "Osteonecrosis/pathology"[Mesh] OR "Osteonecrosis/physiopathology"[Mesh] OR Osteonecroses OR "Bone Necrosis" OR "Bone Necroses" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/anatomy and histology"[Mesh] OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/diagnosis"[Mesh] OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/diagnostic imaging"[Mesh] OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/drug therapy"[Mesh] OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/epidemiology"[Mesh] OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/etiology"[Mesh] OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/metabolism"[Mesh] OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/microbiology"[Mesh] OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/pathology"[Mesh] OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/physiopathology"[Mesh] OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw"</p> <p>AND</p> <p>"Denosumab/adverse effects"[Mesh] OR "denosumab"[MeSH Terms] OR "denosumab"[All Fields] OR "prolia"[All Fields] OR "xgeva"[All Fields] OR "AMG 162"[All Fields] OR "denosumab"[MeSH Terms] OR "denosumab"[All Fields] OR "anti-rankl"[All Fields] OR "anti-rankl antibody"[All Fields] OR "Diphosphonates"[Mesh] OR "Diphosphonates/adverse effects"[Mesh] OR bisphosphonates OR alendronate OR alendronate sodium OR Fosamax OR mk217 OR "mk-217" OR "mk 217" OR "risedronate sodium" OR "Risedronate Sodium/adverse effects"[Mesh] OR risedronate OR "risedronic acid" OR Actonel OR atelvia</p> <p>AND</p> <p>"Jaw/diagnostic imaging"[Mesh] OR "Jaw/drug effects"[Mesh] OR "Jaw/pathology"[Mesh] OR Maxillas OR "Maxillary Bone" OR "Maxillary Bones" OR Maxillae OR jaw OR jaws OR mandible OR maxilla</p>	2702

Cochrane (Trials)	'Osteonecrosis OR Osteonecroses OR "Bone Necrosis" OR "Bone Necroses" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw" in Title Abstract Keyword AND denosumab OR prolia OR xgeva OR "AMG 162" OR "anti-rankl" OR "anti-rankl antibody" OR Diphosphonates OR bisphosphonates OR alendronate OR alendronate sodium OR Fosamax OR mk217 OR "mk-217" OR "mk 217" OR "risedronate sodium" OR risedronate OR "risedronic acid" OR Actonel OR atelvia in Title Abstract Keyword AND Maxillas OR "Maxillary Bone" OR "Maxillary Bones" OR Maxillae OR jaw OR jaws OR mandible OR maxilla in Title Abstract Keyword - (Word variations have been searched)'	253
Scopus	(TITLE-ABS-KEY (Osteonecrosis OR "Osteonecrosis/diagnostic imaging" OR "Osteonecrosis/drug therapy" OR "Osteonecrosis/epidemiology" OR "Osteonecrosis/etiology" OR "Osteonecrosis/metabolism" OR "Osteonecrosis/microbiology" OR "Osteonecrosis/pathology" OR "Osteonecrosis/physiopathology" OR Osteonecroses OR "Bone Necrosis" OR "Bone Necroses" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/anatomy and histology" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/diagnosis" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/diagnostic imaging" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/drug therapy" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/epidemiology" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/etiology" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/metabolism" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/microbiology" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/pathology" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/physiopathology" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw") AND TITLE-ABS-KEY ("Denosumab/adverse effects" OR denosumab OR prolia OR xgeva OR "AMG 162" OR "anti-rankl" OR "anti-rankl antibody" OR Diphosphonates OR "Diphosphonates/adverse effects" OR bisphosphonates OR alendronate OR alendronate sodium OR Fosamax OR mk217 OR "mk-217" OR "mk 217" OR "risedronate sodium" OR "Risedronate Sodium/adverse effects" OR risedronate OR "risedronic acid" OR Actonel OR atelvia) AND TITLE-ABS-KEY ("Jaw/diagnostic imaging" OR "Jaw/drug effects" OR "Jaw/pathology" OR Maxillas OR "Maxillary Bone" OR "Maxillary Bones" OR Maxillae OR jaw OR jaws OR mandible OR maxilla))	832
Web of Science	Tópico: (Osteonecrosis OR "Osteonecrosis/diagnostic imaging" OR "Osteonecrosis/drug therapy" OR "Osteonecrosis/epidemiology" OR "Osteonecrosis/etiology" OR "Osteonecrosis/metabolism" OR "Osteonecrosis/microbiology" OR "Osteonecrosis/pathology" OR "Osteonecrosis/physiopathology" OR Osteonecroses OR "Bone Necrosis" OR "Bone Necroses" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/anatomy and	2085

	<p>histology" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/diagnosis" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/diagnostic imaging" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/drug therapy" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/epidemiology" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/etiology" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/metabolism" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/microbiology" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/pathology" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/physiopathology" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw") AND Tópico: ("Denosumab/adverse effects" OR denosumab OR prolia OR xgeva OR "AMG 162" OR "anti-rankl" OR "anti-rankl antibody" OR Diphosphonates OR "Diphosphonates/adverse effects" OR bisphosphonates OR alendronate OR alendronate sodium OR Fosamax OR mk217 OR "mk-217" OR "mk 217" OR "risedronate sodium" OR "Risedronate Sodium/adverse effects" OR risedronate OR "risedronic acid" OR Actonel OR atelvia) AND Tópico: ("Jaw/diagnostic imaging" OR "Jaw/drug effects" OR "Jaw/pathology" OR Maxillas OR "Maxillary Bone" OR "Maxillary Bones" OR Maxillae OR jaw OR jaws OR mandible OR maxilla)</p> <p>Tempo estipulado: Todos os anos. Índices: SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI, CPCI-S, CPCI-SSH, ESCI.</p>	
<p>BVS (Portuguese and Spanish)</p>	<p>(tw:(osteonecrose OR osteonecrosis OR "osteonecrose da arcada osseodentária associada a difosfonatos" OR "osteonecrosis de los maxilares asociada a difosfonatos")) AND (tw:(denosumab OR "ácido etidróico" OR "ácido etidróico" OR alendronato OR "risedronato sódico")) AND (tw:(maxilares OR "arcada ósseodentária" OR mandíbula))</p>	<p>27</p>
<p>ProQuest</p>	<p>all(Osteonecrosis OR "Osteonecrosis/diagnostic imaging" OR "Osteonecrosis/drug therapy" OR "Osteonecrosis/epidemiology" OR "Osteonecrosis/etiology" OR "Osteonecrosis/metabolism" OR "Osteonecrosis/microbiology" OR "Osteonecrosis/pathology" OR "Osteonecrosis/physiopathology" OR Osteonecroses OR "Bone Necrosis" OR "Bone Necroses" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/anatomy and histology" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/diagnosis" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/diagnostic imaging" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/drug therapy" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/epidemiology" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/etiology" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/metabolism" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/microbiology" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/pathology" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/physiopathology" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw") AND all("Denosumab/adverse effects" OR denosumab OR</p>	<p>33</p>

	<p>prolia OR xgeva OR "AMG 162" OR "anti-rankl" OR "anti-rankl antibody" OR Diphosphonates OR "Diphosphonates/adverse effects" OR bisphosphonates OR alendronate OR alendronate sodium OR Fosamax OR mk217 OR "mk-217" OR "mk 217" OR "risedronate sodium" OR "Risedronate Sodium/adverse effects" OR risedronate OR "risedronic acid" OR Actonel OR atelvia) AND all("Jaw/diagnostic imaging" OR "Jaw/drug effects" OR "Jaw/pathology" OR Maxillas OR "Maxillary Bone" OR "Maxillary Bones" OR Maxillae OR jaw OR jaws OR mandible OR maxilla)</p>	
Open Grey	<p>(Osteonecrosis OR "Osteonecrosis/diagnostic imaging" OR "Osteonecrosis/drug therapy" OR "Osteonecrosis/epidemiology" OR "Osteonecrosis/etiology" OR "Osteonecrosis/metabolism" OR "Osteonecrosis/microbiology" OR "Osteonecrosis/pathology" OR "Osteonecrosis/physiopathology" OR Osteonecroses OR "Bone Necrosis" OR "Bone Necroses" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/anatomy and histology" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/diagnosis" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/diagnostic imaging" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/drug therapy" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/epidemiology" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/etiology" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/metabolism" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/microbiology" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/pathology" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw/physiopathology" OR "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw") AND ("Denosumab/adverse effects" OR denosumab OR prolia OR xgeva OR "AMG 162" OR "anti-rankl" OR "anti-rankl antibody" OR Diphosphonates OR "Diphosphonates/adverse effects" OR bisphosphonates OR alendronate OR alendronate sodium OR Fosamax OR mk217 OR "mk-217" OR "mk 217" OR "risedronate sodium" OR "Risedronate Sodium/adverse effects" OR risedronate OR "risedronic acid" OR Actonel OR atelvia) AND ("Jaw/diagnostic imaging" OR "Jaw/drug effects" OR "Jaw/pathology" OR Maxillas OR "Maxillary Bone" OR "Maxillary Bones" OR Maxillae OR jaw OR jaws OR mandible OR maxilla)</p>	13
Google Scholar	<p>(Osteonecrosis OR Bone Necrosis OR "Medication-Associated Osteonecrosis of the Jaw") AND (denosumab OR prolia OR xgeva OR AMG 162 OR anti-rankL) AND (jaw OR maxilla OR maxillary OR "Maxillary bone" OR mandible)</p>	1590

APÊNDICE 2 – ARTIGOS EXCLUÍDOS E RAZÕES PARA EXCLUSÃO (N= 55)

Autor, ano	Razão para exclusão
Aghaloo <i>et al.</i> , 2010	1
Al-Samman <i>et al.</i> , 2019	2
Brown <i>et al.</i> , 2011	1
Cardona Torjada <i>et al.</i> , 2014	1
Cardoso <i>et al.</i> , 2017	4
Clemon <i>et al.</i> , 2019	1
Corraini <i>et al.</i> , 2017	2
Costa, <i>et al.</i> , 2013	1
Dupic <i>et al.</i> , 2015	1
Etzelsdorfer <i>et al.</i> , 2012	1
Fizazi <i>et al.</i> , 2011	2
Fusco <i>et al.</i> , 2014	1
Fusco <i>et al.</i> , 2017	1
Fusco <i>et al.</i> 2015	1
Fusco <i>et al.</i> , 2011	1
Gambino <i>et al.</i> , 2017	2
Glennane <i>et al.</i> , 2012	1
Grisar <i>et al.</i> , 2016	4
Hasegawa <i>et al.</i> , 2017	2
Henry <i>et al.</i> , 2011	3
Hoefert <i>et al.</i> , 2014	4
Hoefert <i>et al.</i> , 2016	3
Inada <i>et al.</i> , 2019	2
Kim <i>et al.</i> , 2015	6
Kitajima <i>et al.</i> , 2018	1
Li <i>et al.</i> , 2019	2
Loyson <i>et al.</i> , 2017	6
Martins, <i>et al.</i> , 2017	5
Migliorati, <i>et al.</i> , 2009	1
Miller <i>et al.</i> , 2016	1

Niibe <i>et al.</i> , 2015	6
Ogura <i>et al.</i> , 2017	1
Owosho <i>et al.</i> , 2018	2
Rachner <i>et al.</i> , 2013	5
Richardson <i>et al.</i> , 2011	8
Ristow <i>et al.</i> , 2014	6
Roux <i>et al.</i> , 2014	1
Scagliotti <i>et al.</i> , 2012	2
Stopeck <i>et al.</i> , 2010	2
Stopeck <i>et al.</i> , 2010	3
Stopeck <i>et al.</i> , 2010	1
Sugyama <i>et al.</i> , 2015	1
Wang <i>et al.</i> , 2018	4
Watanabe <i>et al.</i> , 2017	6
Weeda <i>et al.</i> , 2006	8
Xue <i>et al.</i> , 2015	6
Yarom <i>et al.</i> , 2017	1
Yazdi <i>et al.</i> , 2015	6
Zavras <i>et al.</i> , 2012	2
Zhang <i>et al.</i> , 2015	1
Authors were not listed 2011	7
Authors were not listed 2006	7
Authors were not listed 2014	7
Authors were not listed 2012	7
Authors were not listed 2012	7

Textos completos excluídos com motivos (n = 55)

- 1- Resenhas, cartas, orientações, opiniões pessoais, capítulos de livros, painéis, editoriais, resumos de conferências, relatos de casos e séries de casos (n = 22);
- 2- Estudos que não relataram nenhuma característica clínica ou de imagem de ONJ (n = 11);
- 3- Estudos in vitro e in vivo (n = 3);

- 4- Estudos que não relataram características de ONJ relacionadas a BF e DMAb (n = 4);
- 5- Estudos que não relataram o desenvolvimento de ONJ após terapia com BFs ou DMAb (n = 2);
- 6- Estudos em que ONJ relacionado a BF e DMAb não foram diferenciados (n = 7);
- 7- Estudos de autores desconhecidos (n = 4);
- 8- Estudos sem texto completo disponível (n = 2).

Referências dos textos excluídos

1. Aghaloo, T. L., et al. Osteonecrosis of the Jaw in a Patient on Denosumab. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68: 950-63.
2. Al-Samman, A. A., et al. Across-sectional survey on medication-related osteonecrosis of the jaws' knowledge and awareness in a sample of dental society. *J Oral Maxillofac Surg.* 2019;47: 926-931.
3. Brown, J. E., et al. Incidence and outcomes of osteonecrosis of the jaw from an integrated analysis of three pivotal randomized double-blind, double-dummy phase 3 trials comparing denosumab and zoledronic acid for treatment of bone metastases in advanced cancer patients or myeloma. *Bone.* 2011;48:18-19.
4. Cardona Torjada, F., et al. Oral bisphosphonates, denosumab and osteonecrosis of the jaws. *Sociedade Espanhola de Medicina de Família y comunitária.* 2014;47:319-20.
5. Cardoso C. L., et al. Radiographic Findings in Patients with Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw. *International Journal of Dentistry.* 2017;2017:1-6.
6. Clemon. M. J., et al. A pragmatic, randomised, multicentre trial comparing 4-weekly vs. 12-weekly administration of bone-targeted agents (denosumab, zoledronate or pamidronate) in patients with bone metastases. *Annals of oncology.* 2019;30: Supplement 3, Page iii73.
7. Corraini, P., et al. Osteonecrosis of the jaw and survival of patients with cancer: a Nationwide cohort study in Denmark. *J Cancer Medicine.* 2017;6: 2271-77.
8. Costa, L., et al. Denosumab and zoledronic acid treatment in patients with genitourinary cancers and bone metástases. *Journal of clinical oncology.* 2013;31:5079.

9. Dupic, G., et al (2015). Bisphosphonate and denosumab-related osteonecrosis of the jaw: Epidemiology, diagnosis and management. *Bull Cancer*. 2015;102:1010-9.
10. Etzelsdorfer, M., et al. Osteonecrosis of the jaws in osteoporosis after aledronate and denosumab. *Oral Dis*. 2012;18:38.
11. Fizazi, K., et al. (2011). Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomized, double-blind study. *Lancet*. 2011;377:813-22.
12. Fusco, V., et al. Osteonecrosis of the jaw (ONJ) in renal cell cancer patients after treatment including zoledronic acid or denosumab. *Supportive care in câncer*. 2014;22:1737-8.
13. Fusco, V., et al. Medication-Related Osteonecrosis of JAW (MR-ONJ) After Bisphosphonates, Denosumab and other Drugs in Advanced Cancer Patients: Recent Experience Data from Rete Oncologica Piemonte Valle D'aosta (North-Western Italy Cancer Network). *Annals of oncology*. 2017;28:S6.
14. Fusco, V., et al. Osteonecrosis of jaw (ONJ) with and without bone exposure in patients receiving antiangiogenic agents (+/- bisphosphonates or denosumab). *Annals of Oncology*. 2015;26:114–122.
15. Fusco, V., et al. Osteonecrosis of the jaw after zoledronic acid and denosumab. *Journal of clinical oncology*. 2011;29:521-2.
16. Gambino, A., et al. Osteonecrosis of jaw (ONJ) after antiresorptive treatment (bisphosphonates, denosumab) of cancer-treatment induced bone loss (CTIBL): a negligible risk? *Annals of Oncology*. 2017;28:1.
17. Glennane, A., et al. An integrated analysis of denosumab versus zoledronic acid (ZA) for the prevention of skeletal-related events (sres) in patients with bone metastases (BMS) secondary to solid tumours. *Journal of oncology pharmacy practice*. 2012;18:21-22.
18. Grisar, K., et al. Osteoradionecrosis and medication-related osteonecrosis of the jaw: similarities and differences. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2016;45:1592-1599.
19. Hasegawa, T., et al. A multicenter retrospective study of the risk factors associated with medication-related osteonecrosis of the jaw after tooth extraction in patients receiving oral bisphosphonate therapy: can primary wound closure and a drug holiday really prevent MRONJ?. *Osteoporos Int*. 2017;28:2465- 2473.

20. Henry, D. H., et al. Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastases in patients with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29:1125-32.
21. Hoefert, S., et al. Zoledronate but not denosumab suppresses macrophagic differentiation of THP-1 cells. An aetiologic model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Clin Oral Invest*. 2014;19:1307-18.
22. Hoefert, S., et al. Effect of bisphosphonates on macrophagic THP-1 cell survival in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology* 2016;12:222-32.
23. Inada, A., Hosohata, K., Oyama, S., Niinome, I., Mori, Y., Yamaguchi M., et al. Evaluation of medication-related osteonecrosis of the jaw using Japanese Adverse Drug Event Report database. *Ther Clin Risk Manag*. 2019;24:59-64.
24. Kim, J. W., et al. Animal model for Medication-related Osteonecrosis of the Jaw with Precedent Metabolic Bone Disease. *Bone*. 2015;81:442-8.
25. Kitajima, S., Mizuno, S., Kogiso, R., Tsuji, C. Severe Maxillary Medication-related Osteonecrosis of the jaw. *Intern Med*. 2018;15:3341.
26. Li, S., et al. Denosumab versus zoledronic acid in cases of surgically unsalvageable giant cell tumor of bone: A randomized clinical trial. *Journal of bone oncology*. 2019;15: 100217
27. Loyson T, et al. Incidence of osteonecrosis of the jaw in patients with bone metastases treated sequentially with bisphosphonates and denosumab. *Acta Clin Belg*. 2018;73:100-109.
28. Martins, A. S., et al. Relevant Factors for Treatment Outcome and Time to Healing in Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws – A Retrospective Cohort Study *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2017;45:1736-1742.
29. Migliorati, CA, et al. New oncology drugs and osteonecrosis of the jaw (ONJ). *The Journal of the Tennessee Dental Association*. 2009;89:36-8
30. Miller, P., et al. A randomized double-blind study of denosumab (DMAb) compared with zoledronic acid (ZOL) in postmenopausal women with osteoporosis previously treated with oral bisphosphonates. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101:3163-70.

31. Nilibe, K., et al. Osteonecrosis of the Jaw in patients with dental prostheses being treated with bisphosphonates or denosumab. *Journal of prosthodontic research*. 2015;59:3-5.
32. Ogura, I., et al. Characteristic Multimodal Imaging of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: Comparison Between Oral and Parenteral Routes of Medication Administration. *Journal of Radiology*. 2017;82:551-560.
33. Owosho AA., Liang, STY., Sax, AZ., Wu, K., Yom, SK., Huryn, JM, et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw: An update on the memorial sloan kettering cancercenter experience and the role of premedication dental evaluation in prevention. *Oral surg Oral med Oral pathol Oral radiol*. 2018;125:440-445.
34. Rachner, T., et al. Osteonecrosis of the Jaw After Osteoporosis Therapy With Denosumab Following Long-term Bisphosphonate Therapy. *Mayo clinic proceedings*. 2013;88:418-19.
35. Richardson, G., et al. Comparison of denosumab versus zoledronic acid (ZA) for the prevention of skeletal-related events in patients with bone metastases from solid tumors. *Asia-pacific journal of clinical oncology*. 2011;7:91.
36. Ristow, C., et al. Effect of antiresorptive drugs on bony turnover in the jaw: denosumab compared with bisphosphonates. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 2014;52:308- 313.
37. Roux, C., et al. Denosumab compared with risedronate in postmenopausal women suboptimally adherent to alendronate therapy: Efficacy and safety results from a randomized open-label study. *Bone*. 2014;58:48-54.
38. Scagliotti, G. V., et al. Overall survival improvement in patients with lung cancer and bone metastases treated with denosumab versus zoledronic acid: subgroup analysis from a randomized phase 3 study. *Journal of thoracic oncology*. 2014;18:23-1029.
39. Stopeck, A., et al. Abstract P6-14-01: Effect of Denosumab Versus Zoledronic Acid Treatment in Patients with Breast Cancer and Bone Metastases: Results from the Extended Blinded Treatment Phase. *Cancer research*. 2010;70.
40. Stopeck A., et al. Denosumab Compared With Zoledronic Acid for the Treatment of Bone Metastases in Patients With Advanced Breast Cancer: A Randomized, Double-Blind Study. *J Clin Oncol*. 2010;28:5132-5139.

41. Stopeck, A., et al. Osteonecrosis of the Jaw After Zoledronic Acid and Denosumab Treatment Reply. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;29:523-24.
42. Suguyama, T., et al. Copper accumulation in the sequestrum of medication-related osteonecrosis of the jaw. *Bone Rep*. 2015;3:40-47.
43. Wang, Q., Liu, J., Qi, S., Liao, X., Liu, D., Pan, J. Clinical analysis of medication related osteonecrosis of the jaws: a growing severe complication in China. *Journal of dental Sciences*. 2018;13:190-197.
44. Watanabe S, Nakajima K, Mizokami A, Yaegashi H, Noguchi N, Kawashiri S, et al. Bone scan index of the jaw: a new approach for evaluating early-stage anti-resorptive agents-related osteonecrosis. *Ann Nucl Med*. 2017; 31: 201- 210.
45. Weeda, LW., et al. Drug induced osteonecrosis of the jaws. *Journal: The Journal of the Tennessee Dental Association*. 2016;86:18-19.
46. Xue, F., et al. Incidence Rate of Potential Osteonecrosis of the Jaw Among Women with Postmenopausal Osteoporosis Treated with Prolia or Bisphosphonates. *Arthritis e Rheumatology*. 2015;67:1.
47. Yarom, N., et al. Rapid onset of osteonecrosis of the jaw in patients switching from bisphosphonates to denosumab *Oral Medicine*. 2017;125:27-19.
48. Yazdi, PM., et al. Dentoalveolar trauma and minor trauma as precipitating factors for medication-related osteonecrosis of the jaw (ONJ): a retrospective study of 149 consecutive patients from the Copenhagen ONJ Cohort. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2015;119:416-422.
49. Zavras, A., I., et al. Pharmacogenetics to screen for drug-induced osteonecrosis of the jaw. *Pharmacogenomics*. 2012;13:985-987.
50. Zhang, X., et al. Osteonecrosis of the Jaw in the United States Food and Drug Administration's Adverse Event Reporting System (FAERS). *J Bone Miner Res*. 2015;31:336-40.
51. Unknown author. Osteoporosis medications and your dental health. *J Am Dental Association*. 2011;142:1320.
52. Unknown author. Osteoporosis drugs and jaw problems. Weighing your risks. *Mayo Clin Health Lett*. 2006;24:6.
53. Unknown author. Osteoporosis drugs linked to jawbone destruction. [J Calif Dent Assoc](#). 2014;42:435.
54. Unknown author. Denosumab and bone metastases. No better than a bisphosphonate. [Prescrire Int](#). 2012;21:204-206.

55. Unknown author (2007). Complications & side effects. Benefits of bone drugs appear to outweigh risks. *TreatmentUpdate*. 2007;19:7-8.

APÊNDICE 3 – RISCO DE VIÉS AVALIADO COM O MASTARI (META-ANALYSIS OF STATISTICS ASSESSMENT AND REVIEW INSTRUMENT)

O risco de viés foi considerado alto se os itens classificados como “sim” representassem até 49% do total de itens, moderado se os itens classificados como “sim” estivessem entre 50% e 69% e baixo se os itens classificados como “sim” somassem mais de 70%.

Estudos transversais

Question	Included Studies /Answer*				
	Klingelhoffer et al, 2016	Matsui et al, 2015	Baba et al, 2018	Heim et al, 2019	Pichardo et, 2019
1. Is sample representative of patients in the population as a whole?	Y	Y	N	Y	N
2. Are the patients at a similar point in the course of their condition/illness?	Y	N	Y	Y	Y
3. Has bias been minimized in relation to selection of cases and of controls?	U	N	Y	Y	Y
4. Are confounding factors identified and strategies to deal with them stated?	U	Y	Y	Y	Y
5. Are outcomes assessed using objective criteria?	Y	Y	Y	Y	Y
6. Was follow up carried out over a sufficient time period?	Y	N	Y	Y	Y
7. Were the outcomes of people who withdrew described and included in the analysis?	NA	N	NA	NA	NA
8. Were outcomes measured in a reliable way?	Y	Y	Y	Y	Y
9. Was appropriate statistical analysis used?	Y	Y	Y	Y	N
% yes/risk	75	55,5	77,7	100	66,6

*Y=Yes, N=No, U=Unclear, NA=Not applicable

Ensaaios clínicos randomizados

Question	Included Studies / Answer*	
	Henry et al, 2014	Saad et al, 2011
1. Was the assignment to treatment groups truly random?	Y	Y
2. Were participants blinded to treatment allocation?	Y	Y
3. Was allocation to treatment groups concealed from the allocator?	Y	Y
4. Were the outcomes of people who withdrew described and included in the analysis?	Y	NA
5. Were those assessing outcomes blind to the treatment allocation?	Y	N
6. Were the control and treatment groups comparable at entry?	N	U
7. Were groups treated identically other than for the named interventions?	N	N
8. Were outcomes measured in the same way for all groups?	Y	Y
9. Were outcomes measured in a reliable way?	Y	Y
10. Was appropriate statistical analysis used?	Y	Y
% yes/risk	80	66,6

*Y=Yes, N=No, U=Unclear, NA=Not applicable



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

Brasília, 13 de maio de 2016.



DECLARAÇÃO – Prorrogação de Prazo

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



Paula Diniz Galera

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

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