

ANDRÉIA MARIA ROCHA MOREIRA

**MODELO ANIMAL DE OSTEONECROSE ASSOCIADA AO USO DE
BISFOSFONATO: AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS
DE HEMIMANDÍBULAS SEM EXTRAÇÃO DENTÁRIA**

BRASÍLIA

2018

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

ANDRÉIA MARIA ROCHA MOREIRA

**MODELO ANIMAL DE OSTEONECROSE ASSOCIADA AO USO DE
BISFOSFONATO: AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS
DE HEMIMANDÍBULAS SEM EXTRAÇÃO DENTÁRIA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. André Ferreira Leite

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Ana Carolina Acevedo

BRASÍLIA

2018

ANDRÉIA MARIA ROCHA MOREIRA

MODELO ANIMAL DE OSTEONECROSE ASSOCIADA AO USO DE
BISFOSFONATO: AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS
DE HEMIMANDÍBULAS SEM EXTRAÇÃO DENTÁRIA

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 16 de julho de 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Ferreira Leite (Presidente)

Universidade de Brasília

Prof^ª. Dra. Bruna Rabelo Amorim

Universidade de Brasília

Prof^ª. Dra. Eliete Neves da Silva Guerra

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Paulo Tadeu de Souza Figueiredo

Universidade de Brasília

*Dedico este trabalho à minha querida mãe, Maria do Carmo. Ao meu pai e amigo, Fernando.
Aos meus irmãos Fernandinho e Leticia. À minha avó Lourdinha. Aos meus avós Lourdes,
Alípio e Bernardo (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida e por ter me concedido a graça de vivenciar essa experiência. Se por graça recebi, também foi pela graça que foi possível desenvolver esse projeto. Agradeço à Maria, minha mãezinha e Senhora da minha vida, e ao meu anjo da guarda, pois acredito que estiveram ao meu lado durante esse período.

À minha querida mãe Maria do Carmo, que sempre me estimulou a estudar. Obrigada por todo o auxílio, incentivo e doação. Por ser um exemplo inspirador de dedicação em tudo o que faz e por todos os valores e ensinamentos que contribuem para minha formação.

Ao meu querido pai Fernando, meu grande amigo, meu porto-seguro. Obrigada por me incentivar nessa jornada todos os dias. Agradeço os conselhos e palavras sábias que sempre me encorajam, tranquilizam e me estimulam a continuar nesse caminho.

Aos meus irmãos, Fernandinho e Letícia, que tanto amo. Obrigada pelo apoio, por me completarem e por preencherem minha vida de alegria. Aos amiguinhos Lincoln e Gegê. Agradeço também a toda a minha família, meus avós, tios e primos, que são tão especiais para mim e também contribuíram para que tudo isso fosse possível.

À equipe de professores que me ajudou a desenvolver esse projeto e que tem contribuído muito para a minha formação. Assim, agradeço:

Ao Professor André Leite, meu orientador desde a graduação. Agradeço por todo o incentivo, paciência e auxílio. Muito obrigada por ter aberto as portas e me concedido a oportunidade de vivenciar essa experiência.

À Professora Ana Carolina, minha co-orientadora. Obrigada pela confiança, por estimular o meu desenvolvimento no laboratório e por ter me ensinado tanto sobre histologia e os caminhos da pesquisa ao longo desses anos.

À Professora Nilce, que também orientou esse trabalho. Minha gratidão por sua contribuição tão significativa, por ter me acompanhado durante o mestrado, por seus ensinamentos e pelo auxílio fundamental na interpretação dos resultados.

Ao Professor Paulo Tadeu, agradeço por todo o apoio e por participar da minha trajetória na universidade ao longo de tantos anos. Muito obrigada por tudo o que me ensinou e pelas oportunidades que me concedeu durante esse período.

Aos Professores Alba e Dominique, que vindo de tão longe me ensinaram tantas técnicas histológicas, inclusive quando eu ainda estava na graduação. Agradeço à Professora Alba pela consideração, incentivo, por todas as vezes que esclareceu minhas dúvidas e pelas sugestões que contribuíram para esse trabalho.

À Professora Eliete, pelas muitas vezes que me ajudou, pelo estímulo constante no laboratório e incentivo ao estudo.

À Professora Bruna, pelos conselhos, por sua colaboração durante a pesquisa e por ter me ajudado no laboratório.

À Professora Dora, que gentilmente me recebeu no laboratório e disponibilizou o scanner que foi fundamental para o trabalho, agradeço muito a sua colaboração. Às Professoras Carla e Lilian, pelas vezes que contribuíram com suas sugestões. À Professora Ana Tereza, por ter auxiliado na parte estatística desse estudo.

Agradeço demais à Lídia, por sua amizade e companheirismo e pelas inúmeras vezes que me ajudou com o trabalho laboratorial. Agradeço também à Polly e ao Alexandre, pelo apoio e pelas vezes que me orientaram no laboratório.

Aos funcionários dos laboratórios de Farmácia, Patologia, Controle e Farmol, por terem disponibilizado equipamentos necessários para essa pesquisa e me ensinado a manuseá-los quando solicitei auxílio.

Aos veterinários Rafael e Ana Luisa, e ao técnico Wilson, por nos ensinarem a lidar com os animais e pelo apoio durante o desenvolvimento do modelo animal. Minha gratidão também aos animais que fizeram parte da pesquisa.

À Josy, pelo companheirismo, amizade, por compartilharmos juntas esse projeto. À Andrea Gama, por sua generosidade e por tantas vezes ter disponibilizado seu tempo para me ensinar técnicas de dissecação, desmineralização e TRAP. Às minhas amigas Raiza e Helora, não só pela amizade de tantos anos mas também por terem colaborado diretamente com essa pesquisa, por tantas vezes que ajudaram com os animais e no laboratório.

Agradeço aos colegas da pós-graduação e a todos os colegas do laboratório, tanto da iniciação científica quanto da pós-graduação: Camila, Túlio, Thaís, Luan,

Daniele Leal, Nathália, Amanda, Rafael, Tassiana, Letícia, Luma, Karen, Cláudio, Guilherme, Carol, Ana Luísa, Shélida, Isadora, Letícia Quirino, Daniele, Érica, Ana Elísia, Augusto, Gabriel, Dra. Fabiana, Elisa, Ana Gabriela, Cínthia, Isabela. Meus amigos, muito obrigada porque tantas vezes me incentivaram e compartilharam seus conhecimentos comigo.

Agradeço também aos amigos e familiares que torceram por mim especialmente Verônica, Daniel, tios Denise e Wellington, Éryka, Rose e Eduardo, Mércia (por sua amizade de tantos anos) e pelo apoio constante e diário no laboratório fornecidos pela Maria, Lia e Dayse. Minha gratidão também à minha antiga escola, Colégio Jesus Maria José, e assim à Irmã Floriana e D. Rosa, à bem-aventurada Rita Amada de Jesus, e aos meus antigos professores desse colégio tão importante em minha vida. Aos colegas e amigos do HMIB, pelo incentivo e por todas as vezes que colaboraram comigo.

À FAP-DF, por financiar essa pesquisa e pelo período em que fui bolsista.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e à Universidade de Brasília que me acolheu como estudante. Sou muito alegre pela oportunidade de estudar nessa instituição.

Por fim, quero agradecer a todas as pessoas boas que Deus foi colocando em minha vida e que apesar de não contribuírem diretamente com esse trabalho ou não serem aqui mencionadas, estenderam as mãos e me auxiliaram. Esse trabalho só foi possível porque tive a contribuição de tantas pessoas. Muito obrigada!

“Deus e o homem estão colocados, em seu respectivo mundo, numa relação única. Em Deus reside a origem de tudo, n'Ele se encerra a plenitude do mistério, e isto constitui a sua glória; ao homem, pelo contrário, compete o dever de investigar a verdade com a razão, e nisto está a sua nobreza (...). O desejo de conhecer é tão grande e comporta tal dinamismo que o coração do homem, ao tocar o limite intransponível, suspira pela riqueza infinita que se encontra para além deste, por intuir que nela está contida a resposta cabal para toda a questão ainda sem resposta.”

(São João Paulo II, Carta Encíclica Fides et Ratio 1998)

RESUMO

INTRODUÇÃO: Vários aspectos relacionados à osteonecrose por medicação ainda não foram completamente esclarecidos, inclusive a patogênese da doença. Muitos modelos animais foram desenvolvidos para estudar essa condição, que tem potencial de provocar significativa morbidade aos pacientes. Nesse contexto, diante da complexidade dessa doença, há necessidade de maior compreensão a respeito dos mecanismos envolvidos na etiopatogenia da osteonecrose.

OBJETIVO: Caracterizar histopatologicamente possíveis alterações provocadas pelo ácido zoledrônico em hemimandíbulas de ratos na ausência de trauma.

MÉTODO: 40 ratos Wistar foram divididos em dois grupos: experimental, composto por 20 animais, receberam 66µg/kg de ácido zoledrônico, três vezes por semana, durante três semanas; e controle, composto por 20 animais, que receberam soro fisiológico em dosagem análoga à administrada no grupo experimental. Os animais foram submetidos à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo e eutanasiados após seis semanas. As hemimandíbulas contralaterais ao trauma, do lado direito, foram submetidas a processamento histológico e analisadas histopatologicamente e por meio de histoenzimologia TRAP e histomorfometria.

RESULTADOS: Durante o experimento, houve a perda de 4 animais e a exclusão de mais 4. Assim, foram analisadas 32 hemimandíbulas, sendo que 18 pertenciam ao grupo experimental e 14 ao controle. Não foram constatadas extensas áreas necróticas, tampouco infiltrado inflamatório e colônias bacterianas. Reação periosteal estava presente nas hemimandíbulas de apenas três animais do grupo experimental. Entretanto, foi observado aumento da densidade óssea volumétrica, do número de osteoclastos morfologicamente alterados e de focos de necrose no grupo experimental em relação ao controle. Também houve redução da infiltração gordurosa da medula óssea no grupo experimental em relação ao controle.

CONCLUSÃO: A administração de ácido zoledrônico foi suficiente para induzir alterações histopatológicas em hemimandíbulas de ratos. Os achados sugerem que o fármaco promove alteração na fisiologia e remodelação óssea, antes da manifestação clínica da doença (caracterizada por osso exposto) e mesmo na ausência de trauma (que é considerada o principal fator de risco para estimular a manifestação da osteonecrose).

PALAVRAS-CHAVE: Osteonecrose por bisfosfonato; bisfosfonato; modelo animal.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Several aspects related to medication-related osteonecrosis have not yet been fully understood, including the pathogenesis of the disease. Many animal models have been developed to study this condition, which has the potential to cause significant morbidity in patients. In this context, in view of the complexity of this disease, there is a need for greater understanding of the mechanisms involved in the pathogenesis of osteonecrosis.

PURPOSE: To characterize histopathologically possible alterations caused by zoledronic acid in hemimandibulas of rats in the absence of trauma.

METHODS: 40 Wistar rats were divided into two groups: experimental, composed by 20 animals which received 66 µg / kg zoledronic acid three times a week for three weeks; and control, composed by 20 animals which received saline solution in a dose analogous to that administered in the experimental group. The animals were submitted to the first lower left molar extraction and euthanized after six weeks. The hemimandibula contralateral to the trauma, on the right side, were submitted to histological processing and analyzed histopathologically and by histoenzimologia TRAP and histomorphometry.

RESULTS: During the experiment, 4 animals died and 4 were excluded. Thus, 32 hemimandibulae were analyzed, 18 of which belonged to the experimental group and 14 to the control group. No extensive necrotic areas, no inflammatory infiltrate, and no bacterial colonies were found. Periosteal reaction was present in the hemimandibula of only three animals in the experimental group. However, there was an increase in volume bone density, number of morphologically altered osteoclasts and foci of necrosis in the experimental group in relation to the control group. There was also a reduction of fatty infiltration of the bone marrow in the experimental group in relation to the control.

CONCLUSION: The administration of zoledronic acid was able to induce histopathological changes in the hemimandibula of rats. The findings suggest that the drug promotes changes in bone physiology and remodeling, prior to the clinical manifestation of the disease (characterized by exposed bone) and even in the absence of trauma (which is considered the main risk factor for stimulating the manifestation of osteonecrosis).

KEY WORDS: bisphosphonate-related osteonecrosis; bisphosphonate; animal model.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural e mecanismos celulares bioquímicos de ação dos bisfosfonatos.....	24
Figura 2 – <i>Timeline</i> do experimento.....	44
Figura 3 – Esquema anatômico de hemimandíbula de rato.....	44
Figura 4 – Análise da densidade óssea volumétrica (BV/TV).....	46
Figura 5 – Cortes de hemimandíbulas de ratos dos grupos controle e experimental.....	51
Figura 6 – Tecido gengival de hemimandíbulas dos grupos controle e experimental.....	52
Figura 7 – Reação periosteal.....	53
Figura 8 – Adiposidade medular.....	54
Figura 9 – Variação da adiposidade medular.....	55
Figura 10 – Densidade óssea volumétrica.....	57
Figura 11 – Processo alveolar em hemimandíbulas do grupo controle e do grupo experimental.....	59
Figura 12 – Osso alveolar na região da raiz méso-lingual dos grupos controle e experimental.....	60
Figura 13 – Osso medular no grupo controle e experimental.....	61
Figura 14 – Tecido ósseo próximo ao nervo alveolar inferior em hemimandíbulas de animais do grupo controle e experimental.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diferenças na densidade óssea volumétrica (BV/TV) e no percentual de espaço medular entre o grupo controle e o grupo experimental.....	56
Tabela 2 – Diferenças no número de osteoclastos entre o grupo controle e o grupo experimental, seguindo metodologia TRAP.....	58
Tabela 3 – Diferenças no número de focos de necrose entre o grupo controle e o grupo experimental.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAOMS	Associação Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais
ATP	Adenosina trifosfato
BP(s)	Bisfosfonato(s)
BRONJ	Osteonecrose por bisfosfonato
BV/TV	Densidade óssea volumétrica (fração de volume ósseo)
C	Celcius
CEUA/UnB	Comitê de Ética de Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília
CIEX	Laboratório de Cirurgia Experimental
CJ	Conjuntivo
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
D	Dentina
DP	Desvio-padrão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EM	Espaço medular
EP	Epitélio
FPP	Farnesil pirofosfato
FS/UnB	Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília
G	Gengiva
g	Grama
HE	Hematoxilina e eosina
Kg	Kilograma
LP	Ligamento periodontal
M	Molar
mg	Miligrama
ml	Mililitro
µm	Micrômetro
MRONJ	Osteonecrose por medicação
N	Nervo
N	Número
NA	Nervo alveolar inferior

Non-N-BPs	Bisfosfonato não nitrogenado
OA	Osso alveolar
OC	Osso cortical
OH	Hidroxila
OM	Osso medular
P	Polpa
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFA	Paraformaldeído
PPAR γ 2	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama 2
PPi	Pirofosfato inorgânico
p-valor	Significância estatística
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kapa B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kapa B
RML	Raiz mésio-lingual do primeiro molar inferior
ROI	Região de Interesse
RP	Reação periosteal
SG	Sulco gengival
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
UnB	Universidade de Brasília
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 BISFOSFONATOS	21
2.2 MRONJ: DEFINIÇÃO E ESTADIAMENTO	26
2.3 EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO	28
2.4 ETIOPATOGENIA	30
2.4.1 Supressão da remodelação óssea	31
2.4.2 Infecção	33
2.4.3 Inibição da angiogênese	34
2.4.4 Toxicidade sobre os tecidos moles	34
2.5 MODELOS ANIMAIS	35
3 OBJETIVOS	39
4 METODOLOGIA	40
4.1 AMOSTRA	40
4.2 ADMINISTRAÇÃO DO MEDICAMENTO	41
4.3 EXODONTIA E EUTANÁSIA	41
4.4 EXAME FÍSICO DOS ANIMAIS	42
4.5 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	42
4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA EM MICROSCOPIA DE LUZ	45
4.7 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	45
4.7.1 Avaliação da Densidade óssea volumétrica (BV/TV)	45
4.7.2 Contagem de Osteoclastos	47
4.7.3 Contagem de sinais de necrose (focos necróticos)	47
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5. RESULTADOS	49
5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA	49
5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA EM MICROSCPIA DE LUZ	49
5.3 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	56
5.3.1 Avaliação da Densidade Óssea Volumétrica (BV/TV) e do percentual de espaço medular	56
5.3.2 Contagem de osteoclastos	58
5.3.3 Contagem de sinais de necrose	62
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXO	90

1 INTRODUÇÃO

Quase 15 anos se passaram desde os primeiros relatos de osteonecrose por bifosfonato, então chamada BRONJ (1, 2), entretanto, sua etiopatogenia ainda não está completamente esclarecida (3, 4). Várias hipóteses estão descritas na literatura e buscam elucidar os processos que resultam no desenvolvimento dessa doença. A compreensão desse cenário é complexa e perpassa também pela necessidade do avanço no entendimento da própria fisiologia do tecido ósseo (5).

Nos últimos anos, a abordagem sobre esse tipo de osteonecrose (BRONJ) vem ganhando espaço em publicações de artigos científicos e na atuação profissional de diferentes especialidades odontológicas, por diversos fatores. Um deles é que a BRONJ não é causada apenas pela administração de bisfosfonatos. Outras drogas antiangiogênicas e antirreabsortivas também apresentam potencial para induzir a doença, razão pela qual essa condição é atualmente denominada osteonecrose por medicação – MRONJ – em vez de osteonecrose por bisfosfonato – BRONJ (6).

Também, muitos trabalhos têm sido publicados com o objetivo de propor estratégias de prevenção e manejo da MRONJ, que tende a ser uma condição de difícil tratamento, sobretudo nos casos em que a doença está mais avançada. Apesar dos progressos nos estudos sobre a MRONJ, ainda não há consenso e evidências suficientes em relação à eficácia de diferentes propostas de tratamentos para essa condição, o que também é reflexo da necessidade de uma maior compreensão a respeito da etiopatogenia da doença (7, 8). Da mesma forma, também é preciso esclarecer lacunas que existem sobre quais condutas poderão ser adotadas em pacientes que recebem essas medicações e apresentam demandas específicas de tratamento odontológico (6, 9 -13).

Além disso, há de se considerar que a prescrição de bisfosfonatos pode proporcionar benefícios aos pacientes e impacto positivo na qualidade de vida, principalmente quando se trata de sua administração em pacientes oncológicos (14 - 16). Em contrapartida, a MRONJ é considerada um efeito adverso grave do uso de bisfosfonatos e, apesar de ser um evento raro, a preocupação em torno dessa condição diz respeito não apenas por seu potencial de gravidade e morbidade, mas também pelo aumento do número de prescrições dessas drogas nos últimos anos

(5, 13) como, por exemplo, em pacientes diagnosticados com osteoporose.

De acordo com a Associação Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais (AAOMS) a osteonecrose por medicação pode ser definida com base em três critérios: 1) osso exposto ou osso que pode ser sondado por fístula intraoral ou extraoral na região maxilofacial que persiste por mais de oito semanas; 2) tratamento atual ou prévio com agentes antirreabsortivos ou antiangiogênicos; 3) ausência de histórico de radioterapia e de doença metastática no complexo maxilomandibular. Esses três parâmetros precisam ser considerados para que um paciente seja diagnosticado com MRONJ (6). Dessa forma, o diagnóstico da doença é eminentemente clínico. Porém, outras ferramentas podem ser utilizadas como métodos auxiliares no manejo da MRONJ, como radiografias e tomografias e avaliação histopatológica, quando devidamente recomendada (17).

A avaliação histopatológica é indicada principalmente nos casos de pacientes com MRONJ que são tratados cirurgicamente, usando os fragmentos de osso removidos durante a cirurgia. Essa conduta em relação a esses casos está bem fundamentada na literatura, na rotina laboratorial e administrativa das unidades de saúde. Embora poucos, existem relatos de casos de pacientes oncológicos em uso de bisfosfonatos que apresentam MRONJ em associação com doença óssea metastática dentro de um mesmo sítio. A osteonecrose pode ocultar a doença maligna associada. Nessas circunstâncias, quando há suspeita de metástase, a análise histopatológica é fundamental por descartar ou confirmar a presença de neoplasia em lesões de MRONJ, considerando que sinais clínicos e radiográficos não podem fornecer o diagnóstico da malignidade (18).

Muitas características histopatológicas da MRONJ já foram descritas. Entretanto, não são patognomônicas, além de a definição histopatológica dessa doença ainda não estar completamente estabelecida (13, 17). A MRONJ também apresenta semelhança histopatológica com outras doenças que afetam o tecido ósseo, como a osteomielite e a osteorradionecrose. Por isso, alguns trabalhos têm analisado e comparado essas diferentes condições com o objetivo de caracterizá-las histopatologicamente (19 - 23). Importante ressaltar que o estadiamento da MRONJ proposto pela AAOMS não leva em consideração as características histopatológicas da doença, pois é fundamentado no diagnóstico clínico e o tratamento cirúrgico nem sempre é indicado. Apesar disso, parece haver alterações histopatológicas

precoces, antes mesmo de manifestações clínicas e imaginológicas como focos de necrose óssea e mudanças morfológicas de osteoclastos (24, 25).

Publicações prévias avaliam histopatologicamente espécimes provenientes de pacientes. A maioria são casos avançados de MRONJ, submetidos a tratamento cirúrgico para remoção de osso necrótico. As principais características histopatológicas descritas são a presença de necrose óssea, constatada por lacunas osteocíticas vazias, ou seja, osteoplastos sem osteócitos; colônias bacterianas associadas ao osso, especialmente bactérias do gênero *Actinomyces*, com coloração basofílica; sequestros ósseos; infiltrado inflamatório sobretudo próximo a zonas de infecção; ulceração dos tecidos moles manifestada por descontinuidade do epitélio e tecido conjuntivo; irregularidade nas superfícies ósseas sugestiva de lacunas de Howship sem osteoclastos agregados; reação periosteal sobre a cortical óssea, exibindo padrão ósseo desorganizado. Além disso, a presença de osteoclastos grandes, multinucleados, disformes e/ou não aderidos à superfície óssea também podem ocorrer (23, 26 - 28).

Visto que para efetuar análise histopatológica é necessário submeter o paciente a procedimento cirúrgico e sabendo-se que esse tratamento não é indicado para todos os pacientes e considerando que o trauma é um dos fatores de risco mais importantes para o surgimento da MRONJ, os modelos animais são uma alternativa viável para o estudo histopatológico da doença (29). Assim, a maioria dos estudos que faz uso de modelos animais usa a extração dentária como fator de “gatilho” para desencadear MRONJ. (29 - 33). Diferentes tipos de modelos animais são descritos na literatura e adotam diversas metodologias em relação à dosagem, associação com traumas ou outras comorbidades (34). Alguns modelos avaliam os efeitos intrínsecos da medicação no tecido ósseo, sem associação com outros cofatores (35, 36).

Mais ainda, os modelos animais são ferramentas importantes para o estudo da MRONJ uma vez que possibilitam a simulação de diferentes situações clínicas e permitem diversos tipos de análise, dentre elas a análise histopatológica, histomorfométrica e histoenzimológica, cernes desse trabalho de dissertação.

Em modelos animais, a avaliação microtomográfica, por exemplo, informa dados sobre a estrutura e massa óssea (37). Esse tipo de análise no estudo da osteonecrose tem seus atributos, dentre outros aspectos, por ser um tipo de

avaliação que se aproxima dos exames tomográficos feitos em pacientes, sugerindo possíveis marcadores tomográficos de MRONJ, como a espessura trabecular e a fração de volume ósseo em relação ao volume total da amostra, conforme demonstrado por Vilarinho (38). O trabalho de Vilarinho et al, 2017, mostrou as alterações precoces encontradas no osso submetido ao tratamento com bisfosfonato, no lado contralateral da mandíbula, onde foram executadas extrações dentárias. Este também é o locus de análise deste trabalho (38).

Há 140 anos a técnica de coloração com hematoxilina e eosina (HE) com fins histológicos foi primeiramente descrita, com aperfeiçoamento nos anos subsequentes. Nesse período, várias técnicas de coloração histológica também emergiram. Desde então, promoveram uma revolução na história da histopatologia. Grande parte dessas técnicas sobrevive ativamente ao longo desses anos, transcorrendo gerações (39). A hematoxilina-eosina ainda é a técnica padrão de coloração para exames histológicos e pode ser capaz de revelar detalhes celulares significativos, inclusive características ultraestruturais dos tecidos e informações sobre o estado funcional de células, quando possível (40).

A histologia é um recurso que pode ser utilizado para auxiliar no esclarecimento da etiopatogenia da MRONJ, uma vez que fornece a oportunidade de visualizar alterações teciduais e de analisar as características microscópicas dessa doença (41, 42). Essa técnica possibilita a descrição morfológica dos tecidos (40). Por meio dela, em modelos animais, é possível estabelecer parâmetros de comparação entre animais tratados ou não com bisfosfonatos e conseqüentemente inferências sobre modificações provocadas pela medicação no tecido ósseo em relação à normalidade (35, 36). Vários avanços na compreensão da MRONJ foram alcançados através de estudos com avaliação histológica. Inclusive, esse método tem fornecido subsídios para algumas teorias que têm sido utilizadas para explicar a MRONJ, o que também justifica o grande número de pesquisas com modelos animais que fazem uso desse recurso em suas metodologias (30, 31, 43).

Por sua vez, a histomorfometria – que é um tipo de análise histológica quantitativa – tem potencial de informar dados sobre os mecanismos pelos quais agentes terapêuticos afetam o tecido ósseo e os processos pelos quais as doenças ósseas ocorrem, uma vez que fornece informações preciosas sobre a atividade celular no osso (37). O exame histomorfométrico consiste em medidas quantitativas

dos tecidos, por meio da análise morfológica da organização e das estruturas microscópicas. Tem avançado principalmente em decorrência do desenvolvimento de softwares que permitem o reconhecimento de imagens e contém ferramentas que avaliam a microestrutura óssea. Atualmente alguns programas disponíveis são gratuitos e fornecem medições precisas, como o Image J (44).

Para esclarecer os mecanismos que estão nos bastidores de alterações morfológicamente detectadas em avaliações histopatológicas, podem ser utilizadas técnicas contemporâneas como testes bioquímicos, celulares e imuno-histoquímicos, uma vez que um diagnóstico anatomopatológico preciso ou no mínimo presuntivo pode ser a premissa para a seleção de investigações moleculares relevantes, quando necessárias (40).

A histoenzimologia é uma técnica que possibilita a localização de células ou outras estruturas teciduais por meio da revelação do produto de uma atividade enzimática (45). A TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato) é um exemplo de histoquímica enzimática e permite a identificação de osteoclastos, que concentram fosfatase ácida. Na década de 60, pesquisadores investigavam a possibilidade do uso dessa enzima para aumentar a acurácia diagnóstica de desordens na medula óssea. Com o avanço nas pesquisas e o aprimoramento da técnica, foi demonstrado que a TRAP poderia ser utilizada, dentre outras indicações, na localização de osteoclastos (46). Assim, a TRAP também é aplicada no estudo da MRONJ e vem sendo utilizada em vários modelos animais com o objetivo de avaliar os efeitos da ação dos bisfosfonatos sobre essas células uma vez que viabiliza uma identificação mais precisa dos osteoclastos no tecido (47, 48).

Mesmo sendo executada na maioria dos estudos experimentais de MRONJ, há algumas intercorrências decorrentes da extração dentária em modelos animais, que podem dificultar a análise morfológica. Essas intercorrências são causadas pela persistência de restos radiculares, pela possibilidade de desenvolvimento de osteomielite ou alveolite concomitante, que provocam um quadro inflamatório importante, o que poderia ser considerado um viés de confundimento (31, 33, 49, 50).

De outra maneira, os estudos mostram a ação, precoce ou tardia dos bisfosfonatos, mesmo sem a concomitância de trauma de qualquer natureza (4, 24, 35, 36, 51); mostram a ação diferenciada em diferentes locais (4, 52, 53) e mostram

ainda, uma diversidade clínica de doses e duração do tratamento na indução de MRONJ (3). Assim, considerando as muitas perguntas sem respostas que perpassam os vários aspectos da MRONJ; a exequibilidade do uso de modelo animal para o estudo da MRONJ; a aplicabilidade das análises histopatológicas e histomorfométricas e, considerando a similitude entre os processos patológicos encontrados na clínica e aqueles produzidos em estudos experimentais, esse trabalho visa apontar possíveis alterações ósseas provocadas por bisfosfonato em hemimandíbulas de ratos, sem associação com trauma ou outras comorbidades.

Assim, o objetivo desse trabalho é analisar as características ósseas de tecidos de animais submetidos ao tratamento com bisfosfonato, sem adição de trauma pela exodontia, buscando visualizar, compreender e, algum momento, controlar os mecanismos fisiopatológicos da osteonecrose medicamentosa, sob a ótica da morfologia, da histomorfometria e da histoenzimologia (TRAP).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BISFOSFONATOS

Os bisfosfonatos são uma classe de medicamentos que inibem a reabsorção óssea. São indicados para o tratamento de distúrbios osteolíticos ou do metabolismo ósseo como osteoporose, doença de Paget, metástases ósseas (principalmente em decorrência de tumores primários situados na mama, pulmão, próstata ou mieloma múltiplo), hipercalemia associada à malignidade, osteogênese imperfeita, entre outros. (14 - 16, 54 - 56).

O efeito antirreabsortivo dessas medicações é atribuído principalmente à sua ação inibitória sobre os osteoclastos. Os bisfosfonatos concentram-se nos ossos por apresentarem alta afinidade pelos cristais de hidroxiapatita. Durante a reabsorção osteoclástica, esses fármacos são fagocitados juntamente com a matriz óssea degradada pela ação das proteases e ácidos liberados por essas células. Uma vez fagocitados, os bisfosfonatos atuam dentro dos osteoclastos prejudicando o desempenho de suas funções (57). Além disso, a presença de bisfosfonatos na superfície óssea dificulta a adesão e a ancoragem dos osteoclastos no tecido ósseo.

Esses medicamentos são análogos sintéticos do pirofosfato inorgânico (PPi) que é um composto naturalmente encontrado no organismo, participa de várias reações intracelulares e é um dos produtos resultantes da hidrólise da molécula de adenosina trifosfato (ATP). Uma pequena quantidade de PPi está presente no meio extracelular no qual essa molécula é considerada um inibidor natural da calcificação dos tecidos moles por sua propriedade quelante (58 - 60).

Na década de 60, os estudos sobre o tecido ósseo estavam concentrados principalmente nas propriedades físico-químicas da matriz óssea. Ao constatarem que os fluidos corporais eram supersaturados em fosfato e cálcio e que esses íons precipitavam na presença de colágeno *in vitro*, pesquisadores presumiram a existência de algum composto que atuava inibindo a calcificação dos tecidos moles (61). Em 1962 foi demonstrado que o PPi atuava nesse processo¹ (62). A partir dessa descoberta, considerando que o PPi é instável e diante de novas possibilidades terapêuticas, despontaram investigações na busca de compostos

¹ Atualmente, sabe-se que os meios que envolvem a calcificação da matriz óssea são bem mais complexos e englobam vários mecanismos além da atuação reguladora do PPi (63).

semelhantes ao PPI, porém mais estáveis e resistentes à hidrólise e à atividade enzimática, que pudessem atuar como fármacos no controle de distúrbios de calcificações ectópicas (59).

Para tanto, foram feitos vários testes, inclusive com bisfosfonatos, que na época eram conhecidos como difosfonatos. Por serem agentes complexantes, eram utilizados na indústria como substâncias anticorrosivas e em instalações de água em escala doméstica e industrial a fim de evitar formação de precipitados. Uma nova perspectiva de indicação do uso de bisfosfonatos surgiu quando, em 1970, foi constatado que os bisfosfonatos também impediam a dissolução de cristais de hidroxiapatita (59, 64). Esse achado, baseado em interações físico-químicas, instigou o desenvolvimento de mais pesquisas pela possibilidade de esses compostos serem utilizados como inibidores da reabsorção óssea (59).

Ao longo da história da pesquisa com bisfosfonatos, novas fórmulas moleculares foram desenvolvidas com o objetivo de aumentar a potência das drogas e afinidade pelo tecido ósseo. Além disso, a compreensão a respeito da estrutura química dos bisfosfonatos e sua relação direta com a farmacodinâmica desses fármacos também colaborou não só para o desenvolvimento de medicamentos mais potentes, mas também para o entendimento de seus efeitos no domínio celular (65).

Nesse contexto, a molécula de PPI é composta por um átomo de oxigênio ligado a dois grupos fosfatos (P-O-P). Nos bisfosfonatos, que são análogos sintéticos mais estáveis do PPI, o átomo de oxigênio é substituído por um átomo de carbono, que também é ligado a dois grupos fosfatos (P-C-P). Duas cadeias laterais (R1 e R2) estão ligadas a esse átomo de carbono central. O conjunto P-C-P é muito importante por garantir a afinidade da droga pelo tecido ósseo. Essa afinidade é aumentada quando a cadeia R1 é composta por um grupo hidroxila – OH. Já a cadeia R2 é responsável pela potência da medicação, que é aumentada quando um átomo de nitrogênio é acrescentado (Figura 1). Com base nesse aspecto, os bisfosfonatos são classificados como não-nitrogenados e nitrogenados (59, 66, 67).

Os bisfosfonatos não-nitrogenados, também conhecidos como de primeira geração, parecem atuar como análogos não hidrolisáveis do PPI. Dessa forma, são incorporados na molécula de ATP, o que resulta na formação de nucleotídeos não hidrolisáveis. O acúmulo desses metabólitos dentro da célula impede a função osteoclástica e promove apoptose (Figura 1). Os bisfosfonatos pertencentes a esse

grupo, como o clodronato e etidronato, possuem menos eficiência farmacológica e menor potência em relação aos nitrogenados (59, 68).

Por sua vez, os bisfosfonatos nitrogenados atuam supostamente através de interferências na via do mevalonato/colesterol (Figura 1). A inibição de enzimas dessa via – em especial a farnesil pirofosfato sintase (FPP sintase) – impede a formação de compostos que participam da prenilação de proteínas que são fundamentais para a sinalização e função celular (59, 69, 70). Assim, há danos (lesão celular) em uma série de processos que são regulados por essas proteínas e que são muito importantes para a manutenção da atividade e da vitalidade dos osteoclastos, como arranjo da morfologia e do citoesqueleto da célula, formação da borda em escova, capacidade de ligação ao osso, tráfego de vesículas e apoptose (28, 59, 71 - 73). Os bisfosfonatos nitrogenados podem ser classificados como de segunda ou terceira geração. Os primeiros são mais potentes que os bisfosfonatos não-nitrogenados e são assim denominados devido ao acréscimo do átomo de nitrogênio em sua estrutura. Pamidronato, aledronato e ibandronato são representantes desse grupo. Já os de terceira geração apresentam o átomo de nitrogênio associado a uma cadeia heterocíclica e são considerados os de maior eficiência (59, 74). O ácido zoledrônico é um exemplo de bisfosfonato nitrogenado e é considerado um dos mais potentes inibidores da reabsorção óssea (59, 75).

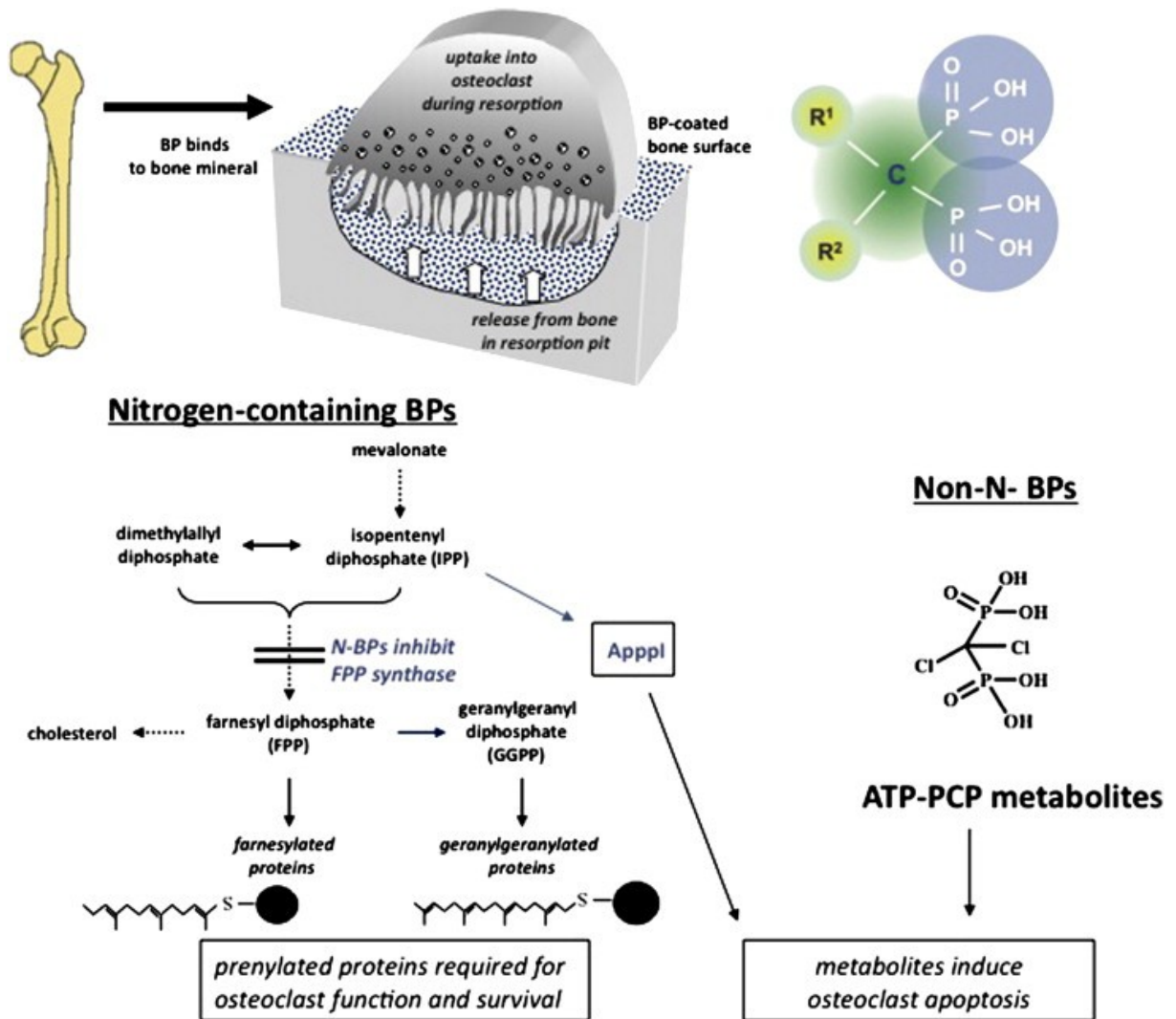


Figura 1 Fórmula estrutural e mecanismos celulares e bioquímicos de ação dos bisfosfonatos. Fonte: Russel, 2011 (59).

A posologia e o tipo de bisfosfonato utilizado variam de acordo com a indicação clínica pela qual o medicamento está sendo prescrito. Os bisfosfonatos podem ser administrados via oral ou intravenosa. A via intravenosa possibilita maior biodisponibilidade, uma vez que apenas 1 a 3% do fármaco é absorvido pela via oral já que os bisfosfonatos tem baixa afinidade por lipídios, o que dificulta sua absorção pela membrana das células da mucosa intestinal. São distribuídos pelo organismo através do sangue, onde estão ligados à albumina e apresentam baixa afinidade por proteínas plasmáticas. O ácido zoledrônico, por exemplo, apresenta meia-vida plasmática de apenas uma a duas horas em contraste com sua meia-vida após incorporação no tecido ósseo, que pode durar anos. Isso ocorre pela alta afinidade

que essas drogas possuem pela hidroxiapatita do tecido ósseo, local em que são armazenados. Esses medicamentos não são metabolizados pelo fígado e são excretados do organismo de forma inalterada na urina através dos rins (74).

Nas doenças osteolíticas há um desequilíbrio entre os processos de formação e reabsorção óssea. Como o processo reabsortivo é mais intenso, há uma redução da densidade óssea o que aumenta a fragilidade do osso e a susceptibilidade à fratura. Por seus mecanismos de ação antirreabsortivos, os bisfosfonatos podem ser considerados fármacos eficientes para o tratamento de doenças osteolíticas (76, 77).

O benefício da prescrição dessas medicações se deve não apenas por sua excelência na manutenção da densidade óssea, mas também pela melhoria da qualidade de vida dos pacientes por proporcionar redução do risco de fraturas patológicas e possivelmente da dor. Além disso, os bisfosfonatos também apresentam atividade antitumoral. Esses fármacos parecem alterar o microambiente ósseo atenuando o crescimento do tumor e possivelmente induzem o acúmulo de metabólitos tóxicos no interior das células malignas em razão de interferências na via do mevalonato. A administração dos bisfosfonatos está inclusive vinculada com melhora da sobrevida de pacientes oncológicos (14, 76, 78 - 80).

A segurança do uso desses fármacos tem sido atribuída à sua alta seletividade pelo tecido alvo uma vez que apresentam intensa afinidade pelo osso (59). Existem alguns efeitos colaterais em decorrência da utilização desses medicamentos, que em geral são bem toleráveis. Os principais efeitos são irritação do trato gastrintestinal quando administrados via oral e sintomas semelhantes à gripe como dor de cabeça, dor nas articulações e fadiga quando administrados via intravenosa (principalmente nas primeiras infusões). Em alguns casos os pacientes podem apresentar linfocitopenia, febre e hipocalcemia. Essas drogas devem ser utilizadas com cautela em pacientes com comprometimento da função renal, já que são excretadas pelos rins (74).

A osteonecrose por medicação é um dos efeitos adversos mais graves que pode ocorrer em decorrência do uso de bisfosfonatos. Esse evento não é frequente apesar de a probabilidade ser maior quando são utilizados bisfosfonatos mais potentes, via intravenosa e com menor intervalo de tempo entre as dosagens como nos pacientes oncológicos (42, 81).

Apesar de rara, a osteonecrose por bisfosfonato (BRONJ), agora chamada de osteonecrose por medicação (MRONJ), apresenta alto grau de morbidade, com impacto negativo na qualidade de vida do paciente (6). Muitos aspectos relacionados à MRONJ ainda precisam ser compreendidos. Entretanto, é evidente o paradoxo desse cenário posto que um dos efeitos indesejáveis mais críticos relacionados ao uso desses fármacos ocorre justamente nos tecidos em que foram projetados para exercer uma incumbência protetora (82).

2.2 MRONJ: DEFINIÇÃO E ESTADIAMENTO

Conforme relatado anteriormente, de acordo com a Associação Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais (AAOMFS), a MRONJ é definida como: osso exposto ou que pode ser sondado através de fístula intra ou extraoral na região maxilofacial, persistente por mais de oito semanas, em um paciente submetido a tratamento atual ou prévio com medicações antirreabsortivas ou antiangiogênicas, e que não tenha recebido radioterapia nem possua metástase óssea evidente nos maxilares (6).

Além dos bisfosfonatos, outras drogas antirreabsortivas também apresentam potencial de induzir a MRONJ, como o denosumab, um anticorpo anti-RANKL que simula a atuação da osteoprotegerina interferindo no sistema RANK/RANKL (receptor ativador do fator nuclear kapa B/ ligante do receptor ativador do fator nuclear kapa B) e impedindo a formação e diferenciação osteoclástica (83). O primeiro caso de osteonecrose induzida por denosumab foi descrito na literatura em 2010 (84). Algumas medicações antiangiogênicas também tem sido associadas à MRONJ, tais como bevacisumab, indicado no tratamento de vários tipos de câncer como colorretal e glioblastoma; sunitinib, indicado no tratamento de câncer renal metastático (85); ziv-aflibercept indicado no tratamento de câncer colorretal metastático refratário (86), entre outras.

A MRONJ pode se manifestar por meio de diferentes sinais e sintomas que exprimem níveis distintos de gravidade e complexidade. Dessa forma, o estadiamento dessa patologia, segundo a AAOMFS, contempla os seguintes critérios de classificação (6):

- *Em risco* = Pacientes que fazem ou fizeram uso de medicações antirreabsortivas e antiangiogênicas mas não apresentam sinais e sintomas nem há evidências de osso necrótico (6).
- *Estágio 0* = É considerado uma forma de osteonecrose sem osso exposto, ou seja, clinicamente, não há indícios de exposição óssea necrótica. Entretanto, os pacientes apresentam achados clínicos, radiográficos ou sintomas inespecíficos. Dentre os achados clínicos podem ser citados a presença de: fístula periodontal ou periapical que não apresenta relação com necrose pulpar decorrente de traumas, restaurações ou cárie; mobilidade dentária não associada à doença periodontal. Os achados radiográficos compreendem áreas osteoescleróticas no osso alveolar ou basilar; mudanças no padrão trabecular como maior densidade óssea e ausência de remodelação óssea pós-extração constatada por persistência da cavidade alveolar; lâmina dura espessa, esclerótica e redução do espaço do ligamento periodontal. Sobre os sintomas, os pacientes podem apresentar dor óssea mandibular que pode irradiar para a região da articulação temporomandibular; dor sinusal que pode vir acompanhada de espessamento ou inflamação da parede do seio maxilar; dor de dente sem fundamentação odontogênica (6).
- *Estágio 1*: Pacientes apresentam osso necrótico exposto ou sondado através de fístula. São assintomáticos e não há indícios de infecção. Podem apresentar sinais radiográficos relatados no estágio 0 (6).
- *Estágio 2*: Pacientes apresentam osso necrótico exposto ou sondado por meio de fístula. Apresentam infecção e frequentemente são sintomáticos. Podem apresentar sinais radiográficos relatados no estágio 0 (6).
- *Estágio 3*: É considerado o mais grave. Os pacientes apresentam osso necrótico com infecção exposto ou sondado por meio de fístula associado a pelo menos uma das seguintes complicações: fratura patológica; fístula extraoral; comunicação oro-sinusal ou oro-nasal; osteólise que atinge o soalho do seio ou a borda inferior da mandíbula; exposição de osso necrótico além do osso alveolar, afetando áreas de seio maxilar, zigoma, borda inferior ou ramo mandibular (6).

Outros autores relatam que bolsa periodontal, edema na mucosa, trismo e dormência do lábio inferior também podem ser considerados como achados clínicos possíveis no estágio 0 (13).

Sinais e sintomas do estágio 0 podem ser considerados como prodrômicos. Os pacientes que estão classificados nesse nível podem evoluir para os estágios subsequentes da doença e, embora há alguns anos tenha sido estimado um risco potencial em torno de 50%, ainda são necessárias mais evidências sobre o valor desse risco de progressão (87).

2.3 EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO

As informações descritas na literatura sobre epidemiologia e fatores de risco da MRONJ variam entre os estudos.

De forma geral, a prevalência e incidência da MRONJ são maiores em pacientes que fazem uso de bisfosfonatos via intravenosa em comparação com aqueles que fazem via oral. Além disso, os pacientes oncológicos, principalmente com mieloma múltiplo têm maior probabilidade de apresentarem MRONJ em relação aos pacientes com osteoporose. As chances do desenvolvimento da MRONJ também são maiores quando há associação com cirurgias e infecções locais (42, 81, 88).

Nesse contexto, a prevalência da BRONJ é estimada entre 0,01 e 0,05% quando bisfosfonatos são administrados via oral, enquanto via intravenosa a prevalência é até cerca de 10% (88). Esse último dado distancia de outro na literatura, na qual a prevalência da BRONJ em pacientes oncológicos em uso de bisfosfonatos intravenosos é até 0,186% (42). Em pacientes tratados com bisfosfonatos orais, a incidência da MRONJ é de 1,04-69/100.000 casos por ano. Já a incidência da MRONJ em pacientes tratados com bisfosfonatos intravenosos é de 0-90/100.000 casos por ano (13).

A MRONJ tende a acometer mais mulheres que homens em uma taxa aproximada de 65,5% e 34,5% respectivamente (81). A média de idade dos pacientes acometidos com MRONJ (estágios 1, 2, 3) é em torno dos 65 anos e tende a ser mais frequente na mandíbula – em torno de 65% – que na maxila – 28%. Aproximadamente 7% dos casos descritos na literatura apresentaram osteonecrose tanto na maxila quanto na mandíbula (89).

A predisposição à MRONJ aumenta quando a doença está associada a outras condições consideradas como fatores de risco, que podem ser locais ou sistêmicos.

Sobre os estudos desse âmbito, ainda são necessárias mais evidências, uma vez que, por ser uma doença com baixa incidência e possibilidade de desenvolvimento em longo prazo, o estabelecimento de grupos controles pareados para comparação com os pacientes tratados não é fácil, em especial com bisfosfonatos, além de haver a possibilidade de fatores de confundimento já que muitos pacientes são sistemicamente comprometidos (90).

Fatores de risco locais podem atuar como gatilhos para a manifestação da doença e a extração dentária é considerada o principal fator de risco para MRONJ, seguida por doença periodontal (89). Esses achados corroboram outros descritos na literatura (91, 92). Outros fatores foram relatados como infecções dentárias, instalação de implantes, cirurgias orais, tratamento endodôntico, traumatismo por próteses, entre outros (89). Essa conjuntura destaca o cuidado odontológico, não apenas no tocante ao acompanhamento e conscientização dos pacientes que fazem uso dessa medicação, mas também evidencia a importância do controle de infecções e da prevenção de procedimentos invasivos após uso de bisfosfonatos, quando possível (81, 89). Nos casos de pacientes que necessitam de extração dentária e ainda não iniciaram a terapia com bisfosfonatos recomenda-se um período de aproximadamente dois meses entre a cirurgia e a administração da primeira dose do antirreabsortivo, se a espera não causar prejuízo para o progresso oncológico, embora esse período ainda não esteja bem consolidado na literatura (91).

No que se refere aos fatores de risco sistêmicos para MRONJ destacam-se a quimioterapia (mais frequente) além do uso de corticosteroides, tabagismo e diabetes (89). Essas informações indicam a necessidade de investigar a história médica e farmacológica dos pacientes em risco (81, 89).

Em relação ao tipo de fármaco indutor da osteonecrose, a maioria dos casos de MRONJ está associada ao uso de antirreabsortivos (bisfosfonatos e denosumab) quando comparadas a outras medicações (89). Quanto maior o tempo de uso de antirreabsortivos, maior tende a ser o risco de desenvolvimento da doença (93). A maior parte dos casos descritos na literatura de MRONJ (estágios 1, 2 e 3) ocorreu em pacientes oncológicos, principalmente com mieloma múltiplo (aproximadamente 30%), seguido por câncer de mama (24%), próstata (8%), rins (1,5%) e pulmão (1%),

enquanto cerca de 27% dos casos são de pacientes com osteoporose/osteopenia (89).

De acordo com um estudo realizado com pacientes na Eslováquia, o risco do desenvolvimento de MRONJ em pacientes oncológicos é 10 vezes maior do que nos não-oncológicos e há 44 vezes mais chance de um paciente com mieloma múltiplo apresentar MRONJ em contraste com pacientes que não possuem câncer e fazem uso de antirreabsortivos (81).

Além disso, um provável fator de risco para o desenvolvimento da MRONJ é o uso de bisfosfonatos seguido pela substituição desse fármaco por denosumab. Esse cenário parece favorecer a aceleração do surgimento da osteonecrose (94; 95). Entretanto, ainda é precoce considerá-lo como fator de risco uma vez são necessários mais estudos que evidenciam essa correlação (94).

2.4 ETIOPATOGENIA

A etiopatogenia da MRONJ ainda não está completamente esclarecida mas várias teorias tem sido propostas na tentativa de explicá-la. Dentre elas podem ser citadas: supressão da remodelação óssea; infecção; inibição da vascularização/angiogênese; toxicidade sobre os tecidos moles, entre outras (6, 96, 97).

Algumas teorias tendem a prevalecer, como a intensa supressão da remodelação óssea, visto que os bisfosfonatos exibem atuação direta sobre o tecido ósseo, principalmente sobre os osteoclastos. Esse efeito é ainda mais significativo diante da possibilidade de o *turnover* ósseo ser maior nos maxilares em relação aos outros ossos do esqueleto (5, 98).

Além disso, a influência do trauma (33) e da infecção (53) também tem destaque na patogênese da MRONJ uma vez que configuram importante fator de risco e achado clínico e histopatológico, respectivamente. Inclusive, o controle de infecção é recomendado aos pacientes em uso de bisfosfonatos para prevenção da MRONJ e a exposição desses pacientes a procedimentos cirúrgicos também não é aconselhada (91, 99, 100).

Entretanto, essas teorias isoladas ou até em conjunto não explicam por si só muitas perguntas a respeito da MRONJ que ainda permanecem sem respostas,

como o porquê de essa patologia se manifestar quase exclusivamente nos maxilares e os mecanismos por trás da atuação dos fatores de risco como “gatilhos” para a doença (96).

Nesse contexto, outras hipóteses têm emergido na tentativa de justificar uma possível atuação conjunta desses fatores, ou seja, do desempenho dos bisfosfonatos sobre diversos tipos celulares. Uma delas é a relação desses fármacos com o pH tecidual. Segundo essa teoria, na presença de infecção, traumas e procedimentos cirúrgicos, há elevação do pH local, o que acarreta a dissociação entre bisfosfonatos e cristais de hidroxiapatita. Uma vez dissociados do tecido ósseo, esses fármacos atingem concentração suficiente para exercer efeitos tóxicos sobre osteócitos, osteoblastos, osteoclastos, queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, prejudicando o processo de cicatrização e induzindo a osteonecrose (96, 101, 102).

Apesar das diferenças entre as explicações, há possibilidade de convergência de algumas dessas hipóteses em vários aspectos, em algum momento da patogênese da doença, com base nos diversos efeitos que os bisfosfonatos podem provocar em tecidos distintos e a maior susceptibilidade dos maxilares à infecção. Nessa circunstância, a MRONJ configuraria uma resposta ao somatório de múltiplas implicações, o que resultaria na incapacidade de manutenção da fisiologia e no desenvolvimento da osteonecrose que, nessa perspectiva, pode ter uma etiologia multifatorial (96).

2.4.1 Supressão da remodelação óssea

De acordo com essa teoria, o desenvolvimento da BRONJ ocorre pela inibição da atividade osteoclástica em decorrência do acúmulo de bisfosfonatos no tecido ósseo. A maxila e a mandíbula estão constantemente em intenso processo de remodelação óssea, uma vez que são submetidas a traumas e cargas mecânicas que necessitam de reparo. Uma vez que o *turnover* ósseo é reduzido pela lesão à função dos osteoclastos ou indução dessas células à apoptose, há prejuízo na remodelação óssea. Em situações nas quais há traumas maiores como a extração dentária, o fracasso na cicatrização pode ser resultado também da incapacidade dos

osteoclastos de promoverem a reabsorção óssea, culminando na osteonecrose (6, 96, 103, 104).

A inibição da atividade reabsortiva tem sido estreitamente associada com a infecção e o trauma. Um evento traumático expõe o osso às bactérias da cavidade oral, o que aumenta a predisposição à MRONJ em especial em um contexto de redução da eficiência do reparo ósseo (5, 104). A compreensão dos efeitos isolados de cada um desses fatores na indução da MRONJ ainda é limitada (5).

O entendimento da fisiologia da remodelação óssea poderá auxiliar na compreensão de muitos aspectos sobre a patogênese da MRONJ. A remodelação é um processo extremamente complexo. Na tentativa de melhor elucidar esses mecanismos, estudos têm sido feitos e, de certa forma, avanços têm sido alcançados sobre a biomecânica do tecido ósseo bem como das células que o compõe e a respectiva dinâmica de estimulação recíproca entre essas células, que também sofrem influência de hormônios e outros mediadores químicos. O conceito de mecanotransdução também tem sido aplicado nesse contexto. Assim, o desenvolvimento de mais estudos poderá colaborar no esclarecimento da possível atuação desse panorama na etiologia da MRONJ (5).

Além dos efeitos sobre os osteoclastos (especificamente na via do mevalonato), os bisfosfonatos também interferem nos osteoblastos e nos osteócitos. Estudo *in vitro* demonstram que os osteoblastos são sensíveis aos bisfosfonatos, que inibem sua proliferação e os induzem à apoptose (105 - 108).

Em relação aos osteócitos, os bisfosfonatos parecem exercer um efeito tóxico sobre essas células (109) e é provável que influenciem no processo de mecanotransdução, porém mais evidências são necessárias. A mecanotransdução compreende um mecanismo fisiológico no qual sinais mecânicos estimulam uma resposta celular. No tecido ósseo, osteócitos são mecanossensores que detectam a movimentação do fluido dentro dos canalículos do osso e convertem esse sinal mecânico em uma resposta bioquímica que é transmitida a outras células, que respondem com formação ou reabsorção óssea. Assim, os osteócitos desempenham importante papel na homeostase óssea e na regulação da remodelação. Possivelmente, os bisfosfonatos podem interferir nesse processo (5).

Os bisfosfonatos também afetam as propriedades mecânicas do tecido ósseo. Esses fármacos reduzem o tamanho e a qualidade dos cristais de hidroxiapatita,

alterando o módulo de elasticidade e dureza do osso (110). Além disso, induzem o acúmulo de microfraturas que, não reparadas, alteram a biomecânica óssea e podem também contribuir para a etiologia da osteonecrose (111).

Embora ainda não tenha associação direta com a MRONJ, é importante descrever alguns efeitos dos bisfosfonatos sobre o tecido ósseo. Os bisfosfonatos também parecem atuar suprimindo a adipogênese (112). Osteoblastos e células gordurosas da medula óssea possuem precursores em comum – as células-tronco mesenquimais (113). Assim, parece existir uma relação inversa na diferenciação dessas células, de forma que fatores de indução de adipócitos dificultam a osteogênese e fatores de indução óssea reduzem a adipogênese (112, 114). Essa dinâmica é complexa e o equilíbrio desse processo envolve fatores químicos (como dexametasona e insulina), físicos (como a força mecânica) e biológicos (idade e metabolismo), (115).

Em um modelo animal, ratos com osteoporose induzida apresentaram aumento da quantidade de gordura nos espaços medulares e perda óssea. Esse processo parece ser revertido pela presença dos bisfosfonatos, que resultou na redução da quantidade de células gordurosas dos espaços medulares e inibição da perda óssea (112). O efeito supressivo dos bisfosfonatos sobre a adiposidade da medula associado ao aumento da densidade óssea também parece ocorrer em pacientes com osteoporose que fazem uso dessas medicações (116).

2.4.2 Infecção

A infecção parece desempenhar um papel considerável na etiopatogenia da MRONJ. A maioria das amostras analisadas histopatologicamente, tanto de pacientes como de pesquisas desenvolvidas em animais, revelam a presença de infecção nos tecidos. (23, 27, 32, 117). O principal gênero de bactérias identificadas nos estudos são colônias *Actinomyces* associadas ao osso necrótico (19, 118 - 120). A maior parte das bactérias são anaeróbias, o que também sugere a possível influência da doença periodontal na etiologia da MRONJ (121).

Além disso, a infecção é uma das teorias que pode sugerir o porquê de a MRONJ se manifestar quase exclusivamente nos maxilares, que são isolados do meio bucal apenas por uma fina camada de epitélio e conjuntivo. O rompimento

dessa barreira, que pode ocorrer através de traumas maiores ou menores como na própria mastigação, expõe o osso às bactérias do meio bucal. Além disso, os dentes atuam como uma importante porta de entrada para os patógenos, por meio do ligamento periodontal e também de infecções periapicais, por exemplo (97, 104, 122).

2.4.3 Inibição da angiogênese

Alguns estudos demonstram que o acúmulo de bisfosfonatos no tecido ósseo altera a formação de novos vasos, atua sobre as células endoteliais e diminui a expressão de fator de crescimento endotelial vascular. Assim, esses fármacos parecem reduzir o suprimento sanguíneo dos maxilares prejudicando a cicatrização (123 - 126).

Um argumento contrário ao protagonismo dessa teoria na patogênese da MRONJ é que a doença se desenvolve tanto na mandíbula quanto na maxila – apesar de a prevalência da MRONJ ser maior na mandíbula, o número de casos que afetam a maxila ainda é considerável (89). Em contrapartida, a osteorradionecrose, que é outra patologia osteonecrótica caracterizada por intensa hipóxia e hipovascularização, afeta majoritariamente a mandíbula e praticamente não se desenvolve na maxila, que é mais vascularizada (127).

Dessa forma, quando a MRONJ é comparada com a osteorradionecrose, depreende-se que o efeito inibitório dos bisfosfonatos sobre a angiogênese não justifica, por si só, o desenvolvimento dessa condição. No entanto, pode contribuir para o processo, considerando a possibilidade de a etiopatogenia da MRONJ ser multifatorial (97, 122). Tanto que pacientes submetidos à terapia antirreabsortiva concomitante à antiangiogênica apresentam 5 a 10 vezes mais chances de desenvolvimento da osteonecrose quando comparados aos que fazem tratamento somente com antirreabsortivos (128).

2.4.4 Toxicidade sobre os tecidos moles

Os bisfosfonatos também parecem inibir a proliferação de queratinócitos e fibroblastos e induzi-los à apoptose. Segundo essa teoria, perante um trauma, a

atuação desses fármacos sobre os tecidos moles afeta o fechamento da ferida, expondo o tecido ósseo à cavidade oral (129, 130). A toxicidade dos bisfosfonatos sobre o tecido mole também fundamenta a exposição direta do osso ao meio bucal (97).

Desde 2007, poucos anos após o primeiro relato de MRONJ em 2003 (1), essa hipótese despontou como uma alternativa para a patogênese da osteonecrose, creditada principalmente à redução da remodelação óssea. Motivados também pelos efeitos colaterais esofágicos decorrentes da administração via oral de bisfosfonatos, os autores postularam que a concentração de bisfosfonatos no tecido ósseo é alta o suficiente para exercer um efeito tóxico sobre o tecido mole. Na presença de procedimentos dentários invasivos, mais bisfosfonatos são liberados, inibindo a capacidade de reparo tecidual e resultando em osso exposto susceptível à infecção (131).

Muitas incertezas sobre a causalidade da MRONJ ainda permanecem, inclusive o dilema se a osteonecrose surge “de dentro para fora” ou “de fora para dentro”, ou seja, se a exposição óssea é resultado de alterações iniciais no osso e os tecidos moles são posteriormente afetados ou se o efeito tóxico dos bisfosfonatos sobre os tecidos moles levam à exposição óssea e, mais ainda: se ambos estão simultaneamente envolvidos (131, 132).

2.5 MODELOS ANIMAIS

Modelos animais são importantes ferramentas utilizadas para o estudo de doenças que afetam os seres humanos e podem auxiliar na elucidação de processos patogênicos e proposição de tratamentos. Roedores como ratos e camundongos tem sido as cobaias mais utilizadas para esses modelos devido ao seu tamanho reduzido que permite uma fácil manipulação, além da semelhança genética com seres humanos e alta capacidade reprodutiva desses animais. Assim, vários modelos animais são descritos na literatura com o objetivo de compreender melhor a patofisiologia da MRONJ (34).

Um dos primeiros modelos animais com o objetivo de estudar a MRONJ foi desenvolvido em cães a fim de avaliar os efeitos de bisfosfonatos administrados via oral no tecido ósseo em 2008 (133). Em 2009, foi publicado um estudo com ratos

Sprague-Dawley que associou a administração de bisfosfonatos e corticosteroides à exodontia e induziu a MRONJ clinicamente (49). Desde então muitos modelos tem sido descritos na literatura. Apesar disso, o potencial osteonecrótico dos bisfosfonatos já havia sido relatado em 1981 por Gotcher & Jee (134), antes mesmo de a MRONJ ser identificada e reconhecida como entidade patológica (34).

Os modelos animais têm reproduzido com sucesso lesões osteonecróticas equivalentes à MRONJ em humanos, tanto na apresentação clínica e radiográfica quanto histopatologicamente. Clinicamente, essa osteonecrose é evidenciada pela presença de osso exposto na cavidade oral (29, 48, 49, 111). A avaliação por exames de imagem é feita sobretudo através de exames microtomográficos e radiográficos e revelam reação periosteal, sequestro ósseo, destruição cortical, osteólise, osteoesclerose, aumento do volume ósseo entre outros (4, 31, 33, 38, 50). Esses resultados corroboram sinais de imagem apresentados por pacientes conforme registros na literatura (135).

A descrição histopatológica da osteonecrose em modelos animais compreende, dentre outras características: osso necrótico, caracterizado por lacunas osteocíticas (osteoplastos) vazias; infecção; sequestro ósseo; inflamação (principalmente próxima a sequestros e infecções); reação periosteal (31, 48, 53). Esses achados também estão em consonância com os apresentados por pacientes (23, 26, 27).

Além disso, alguns estudos relataram alterações nos osteoclastos. Essas células, na presença de bisfosfonatos, podem apresentar mudanças de forma e de tamanho – ficam mais arredondadas e maiores – e não aderidas à superfície óssea (25, 47, 136, 137). Da mesma forma, essas variações morfológicas nos osteoclastos também foram encontradas em espécimes de pacientes avaliados histopatologicamente (26, 28).

Os modelos animais têm contribuído também para o esclarecimento de várias questões a respeito da MRONJ, inclusive sobre o próprio processo de indução da doença. Diversos estudos evidenciaram a importância do trauma, especificamente a exodontia, como estímulo para a manifestação da MRONJ (30, 31, 32, 33). Outros fatores de risco também têm sido apontados, como infecção periodontal (3, 138) e lesões periapicais (139, 140), apesar de a influência desse último como fator de risco ser controversa (141).

Seja para aumentar as chances de indução de osteonecrose, seja para avaliar o impacto de possíveis fatores de risco sistêmicos no desenvolvimento da MRONJ, alguns modelos associam comorbidades à administração de bisfosfonatos como, por exemplo, carência de vitamina D (142), diabetes (143), uso de corticosteroides (49).

Sobre a patogênese da MRONJ, alguns modelos enfatizaram o papel da infecção nesse processo (32, 50, 53). Outros destacaram a inibição da angiogênese e da vascularização (4, 52). O prejuízo na cicatrização dos tecidos moles também foi relatado, através da redução do reparo da integridade do epitélio (33, 52).

A supressão da remodelação óssea foi muito explorada em alguns modelos, principalmente por causa dos efeitos diretos dos bisfosfonatos sobre o tecido ósseo (33, 48, 136, 137). Inclusive, alguns estudos apontaram diminuição da formação óssea pós-extração dentária (48, 52), em conformidade com achados radiográficos de pacientes que apresentaram permanência do alvéolo após exodontia (135).

Nesse contexto, muitos estudos avaliaram as alterações provocadas pelos bisfosfonatos no tecido ósseo dos maxilares, sem associação com fatores de risco locais e sistêmicos. Esses trabalhos são importantes por descreverem alterações morfológicas precoces, antes da manifestação da doença, como focos de necrose óssea (24, 35, 36), aumento do volume ósseo (4, 51) e redução da vascularização e do turnover ósseo (4).

Em outros modelos também foi possível observar alterações precoces semelhantes, mesmo na presença do trauma. Nesses estudos a doença não foi clinicamente evidenciada por exposição óssea. Entretanto, a avaliação histopatológica apontou presença de microfraturas (111), focos de necrose (31), alteração nos osteoclastos (137) e redução da remodelação óssea (52, 137)

A maioria dos modelos utilizou ratos e camundongos para o estudo da MRONJ. Entretanto, há publicações de trabalhos feitos com outros animais como cães (133, 144) e *minipigs* (53).

Ademais, os modelos também têm sido utilizados para investigar perspectivas de tratamento e prevenção da MRONJ. Por exemplo, alguns estudos avaliaram alternativas que, em maior ou menor grau, resultaram em algum efeito positivo em relação à osteonecrose em animais, como a laserterapia (145), geranylgeraniol (146); pentoxifilina (147); vitamina D (148), esponja de colágeno (149), teriparatida – que é

contraindicada para pacientes com osteossarcoma e metástase óssea (150 - 152). Outros modelos utilizaram recursos que não foram efetivos para a prevenção ou tratamento da MRONJ, como o uso do chá verde, por exemplo (153).

Diante do exposto, foi observado que os modelos apresentaram metodologias diversificadas. Por um lado, a diferença metodológica nos estudos dificulta a comparação entre resultados. Por outro lado, essa variação possibilita a simulação de diversas situações clínicas a que os pacientes podem estar expostos e suas respectivas repercussões na patogênese da MRONJ, como diferenças nas dosagens e tempo de administração da medicação, presença ou ausência de traumas e comorbidades, entre outros (34).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi realizar estudo histopatológico e histomorfométrico de hemimandíbulas de ratos submetidas ao tratamento com ácido zoledrônico sem extração dentária.

Os objetivos específicos foram:

- a) Avaliar a formação de sequestro ósseo, infecção, inflamação e reação periosteal.
- b) Avaliar a adiposidade da medula óssea amarela.
- c) Avaliar quantitativamente o número de osteoclastos, sinais de necrose óssea e fração de volume ósseo.
- d) Inferir, com base na literatura comparada, a ação do ácido zoledrônico sem o trauma concomitante.

4 METODOLOGIA

A execução deste projeto de pesquisa de indução de MRONJ em modelo animal pode ser dividida em duas partes: a primeira, que foi a indução da MRONJ e análise macroscópica e microtomográfica; a segunda, compreendendo a análise microscópica e que é objeto dessa dissertação. A primeira parte foi desenvolvida no segundo semestre de 2016, durante a execução do projeto de mestrado de Josy Lorena Peres da Silva Vilarinho (154), cujos resultados foram publicados recentemente (38).

A segunda parte, que consiste nesse trabalho de dissertação, compreende a avaliação histológica das hemimandíbulas que não foram submetidas à extração dentária. No modelo de indução de MRONJ todos os animais foram submetidos à exodontia na hemimandíbula esquerda (38, 154). Entretanto, apenas o lado direito, que não estava associado ao trauma, foi analisado.

Este projeto foi aprovado no Comitê de Ética de Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (CEUA) em 12 de janeiro de 2012 sob o protocolo UnBDOC número 41597/2010 (ANEXO).

4.1 AMOSTRA

O experimento foi composto por 40 ratos fêmeas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) com idade e peso aproximados de 30 dias e 180g, respectivamente. Os ratos foram adquiridos no Biotério da Universidade de São Paulo (USP) e transportados via aérea. Foram alocados no Biotério de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, onde, por duas semanas antes do início do experimento, foram submetidos ao período de aclimação, em temperatura média de $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro/escuro de 12/12h e com acesso à água e à ração *ad libitum* (154). Os animais foram colocados em 12 caixas de polipropileno com tampa zincada (gaiolas), cada uma contendo 3 a 4 animais. Cada roedor foi identificado através de marcação com caneta permanente vermelha na cauda. A marcação era reforçada duas a três vezes por semana.

Os animais foram distribuídos em dois grupos: Controle (composto por 20 animais) e Experimental (composto por 20 animais).

4.2 ADMINISTRAÇÃO DO MEDICAMENTO

A administração das medicações iniciou após o período de ambientação no biotério. Os animais do grupo Experimental receberam ácido zoledrônico solução injetável de 4mg/5mL (Laboratório Novartis, Suíça, adquirido a partir da loja virtual 4Bio Medicamentos S.A., São Paulo) via intraperitoneal, na dosagem de 66 µg/kg, três vezes por semana, durante três semanas (Figura 2). Essa dosagem é equivalente a doses administradas em pacientes oncológicos (138). Já os animais do grupo Controle receberam soro fisiológico três vezes por semana durante três semanas (154).

4.3 EXODONTIA E EUTANÁSIA

Após o término do período de administração da medicação, todos os animais foram submetidos à extração do primeiro molar inferior esquerdo no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (CIEX – FS/UnB) (38, 154).

Decorridas seis semanas a partir da extração dentária, os animais foram eutanasiados por meio do agente inalatório dióxido de carbono segundo as orientações que constam na “Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)” (155). Após a confirmação da morte, foram posicionados na guilhotina para decapitação e em seguida foi feito o exame clínico de cada roedor, por um único operador, conforme descrição a seguir. A eutanásia seguida pelo exame clínico foi feita um animal por vez.

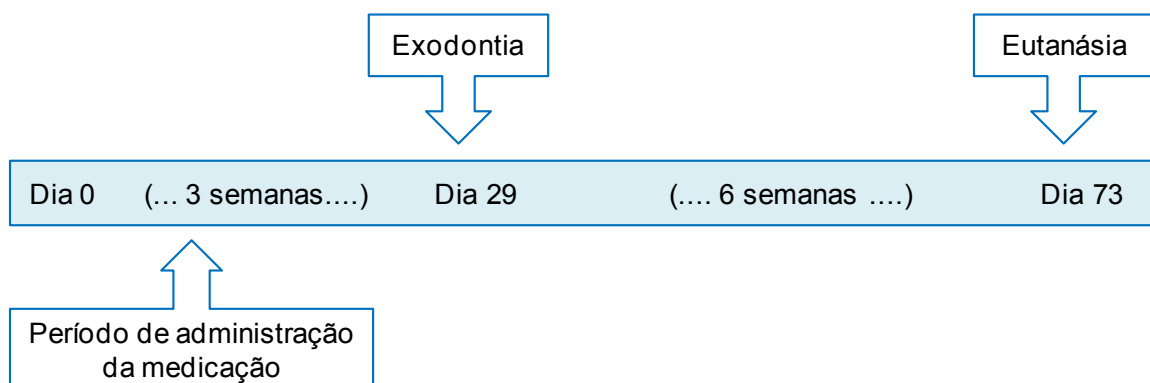


Figura 2 *Timeline* do experimento.

4.4 EXAME FÍSICO DOS ANIMAIS

O exame físico foi realizado em sala com iluminação apropriada (foco de luz), por meio de observação direta e foi utilizada sonda exploradora. Após a decapitação, os tecidos moles foram afastados com o auxílio de pinça e cabo de bisturi e foram feitas fotografias e avaliação quanto à presença ou não de exposição óssea, cicatrização dos tecidos moles, fístula intra e/ou extraoral e secreção purulenta. Em seguida, o excesso de tecido mole foi dissecado através da remoção da pele, separação das hemimandíbulas e remoção da língua e de parte dos músculos submandibulares entre as hemimandíbulas e novamente foram feitos reexame físico (para confirmação) e fotografias (154).

4.5 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Imediatamente após a eutanásia e exame físico, cada espécime – nesse momento composta pela cabeça do animal com excesso de tecidos moles dissecados e hemimandíbulas separadas, mas ainda unidas ao crânio – foi colocada em um frasco plástico com identificação do rato correspondente, composto por 300ml de solução fixadora. O agente fixador utilizado para este estudo foi o paraformaldeído tamponado 4% (PFA 4%) com pH 7,4 e molaridade 0,1Molar (0,1M) – tampão fosfato. Os frascos foram tampados, mantidos em temperatura ambiente e as amostras permaneceram na solução fixadora por aproximadamente 48 horas.

Após as 48 horas de fixação, a próxima etapa do processamento histológico consistiu na desmineralização das amostras. Para isso, as amostras foram retiradas dos frascos com PFA e, na capela de exaustão, foi feito o refinamento da dissecação com lâmina e cabo de bisturi, o tecido gengival mantido, as hemimandíbulas removidas e em seguida imersas na solução desmineralizadora. As duas hemimandíbulas correspondentes a cada animal foram colocadas em Tubo Falcon de 50ml devidamente identificado (1 tubo Falcon por animal). A solução utilizada para a desmineralização foi ácido etilenodiaminotetracético 4,13% (EDTA 4,13%) com pH 7,4, de acordo com Warshawky & Moore, 1967 (156). A solução descalcificante foi trocada duas a três vezes por semana durante 33,5 semanas.

Uma vez desmineralizadas – com consistência borrachoide e pouca resistência à flexão – as amostras foram colocadas em cassetes com etiquetas de identificação de cada hemimandíbula. Em seguida, os cassetes foram dispostos em um béquer para lavagem, que foi feita com tampão fosfato-salino 0,01M (PBS 1x) pH 7,4 durante três dias e com troca diária da solução.

Após a lavagem, as amostras foram desidratadas em banhos de soluções com concentrações ascendentes de álcool etílico, clarificadas em tolueno, impregnadas em banhos de parafina Paraplast® a uma temperatura máxima de 60°C e incluídas em parafina Paraplast® em moldes para inclusão feitos com papel de embalagem de luva cirúrgica (pois suportam o calor da parafina quente).

Após a etapa de inclusão das hemimandíbulas, os blocos de parafina foram cortados no micrótomo rotativo Leica RM2125RT. Cortes coronais de espessura 7 µm (micrômetros) foram realizados. Os primeiros cortes foram feitos a partir da região do forame mentual até a região do início da raiz mesio-vestibular do primeiro molar inferior, de maneira que a cada 10 cortes desprezados, três ou quatro em sequência foram utilizados para fazer as lâminas. A partir da raiz mesio-vestibular, todos os cortes foram usados para a confecção das lâminas, sem descartar. A amostra foi cortada até o final da raiz mesio-lingual do primeiro molar inferior (Figura 3).

As amostras foram coradas com HE - hematoxilina-eosina - e colorações tricrômicas de Masson e de Goldner. Foi feito histoenzimologia TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato) de acordo com Córdova et al em duas lâminas com cortes localizados na região da raiz mesio-lingual (Figura 3B). As lâminas coradas por TRAP foram contracoradas com hematoxilina de Harris (136).

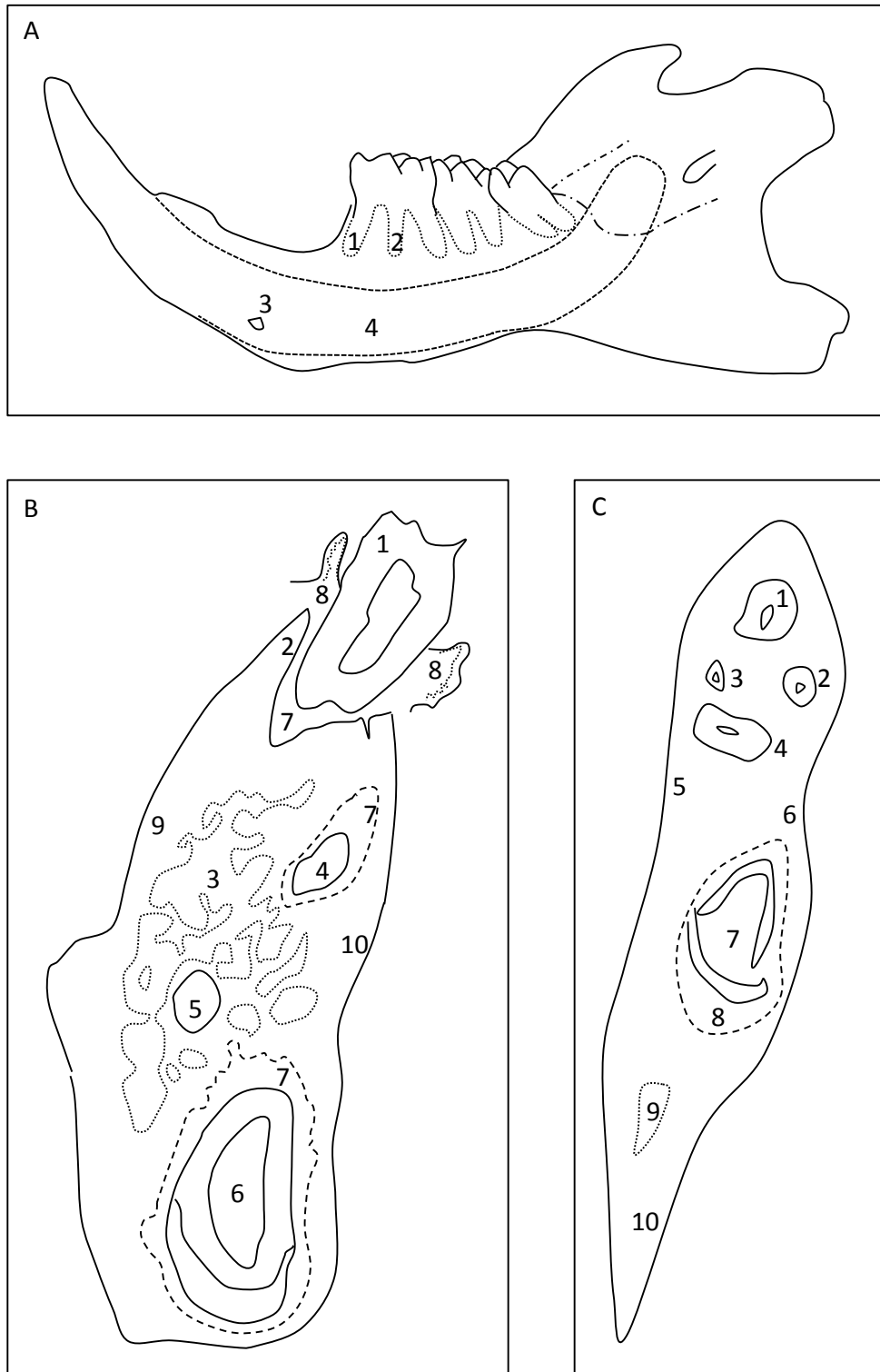


Figura 3 Esquema anatômico de hemimandíbula de rato. A Plano Sagital: 1 = raiz méso-vestibular; 2 = raiz méso-lingual; 3 = forame mental; 4 = incisivo. B Plano Coronal: 1 = coroa do primeiro molar; 2 = crista alveolar; 3 = espaço medular; 4 = raiz méso-lingual do primeiro molar; 5 = nervo alveolar inferior; 6 = incisivo; 7 = ligamento periodontal; 8 = gengiva; 9 = cortical óssea vestibular; 10 = cortical óssea lingual. C Plano axial: 1 = raiz méso-vestibular do primeiro molar inferior; 2 = raiz méso-lingual do primeiro molar inferior; 3 = raiz intermediária do primeiro molar inferior; 4 = raiz distal do primeiro molar inferior; 5 = cortical óssea vestibular; 6 = cortical óssea lingual; 7 = incisivo; 8 = ligamento periodontal; 9 = espaço medular; 10 = região posterior da mandíbula.

4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA EM MICROSCOPIA DE LUZ

Os cortes foram observados e analisados em microscópio de luz Axioplan, Zeiss, e as lâminas foram escaneadas pelo aparelho AperioScanner ScanScope localizado no Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da UnB e avaliadas e fotografadas através do *software* Aperio ImageScope versão 12.3.2.8013.

Os cortes foram avaliados qualitativamente quanto à presença ou ausência de necrose óssea, sequestro ósseo, infecção, inflamação, reação periosteal e adiposidade da medula óssea.

4.7. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

4.7.1 Avaliação da Densidade óssea volumétrica (BV/TV)

Três parâmetros de análise histomorfométrica foram avaliados. O primeiro foi a densidade óssea volumétrica (BV/TV) que é a fração do volume ósseo (BV) no volume total (TV) da amostra (157) expresso em porcentagem.

Através do *software* Aperio ImageScope versão 12.3.2.8013, foi selecionado um corte correspondente a cada animal, aproximadamente na mesma região anatômica. Em seguida, com um aumento 7,4x, uma área de 731960 μm^2 de osso medular, localizada acima do nervo mentoniano e abaixo da raiz méso-lingual do primeiro molar inferior direito foi selecionada, fotografada e salva no formato TIF. Essa área foi denominada região de interesse (ROI) e abrangeu a maior quantidade possível de espaço medular (Figura 4).

Em seguida, cada imagem foi trabalhada no programa Adobe Photoshop® CS2 versão 9.0 a fim de prepará-la para análise. Por meio da ferramenta *Magic Wand Tool*, tolerância 32, o tecido ósseo foi mascarado como preto e o espaço medular branco. As novas imagens também foram salvas no formato TIF e abertas no programa ImageJ 1,50e, onde foi feita a análise das medidas. Para tanto, foi programada uma profundidade de 8 bit e a imagem foi selecionada e analisada através da ferramenta *Analyse>Measure* – Figura 4 (44).

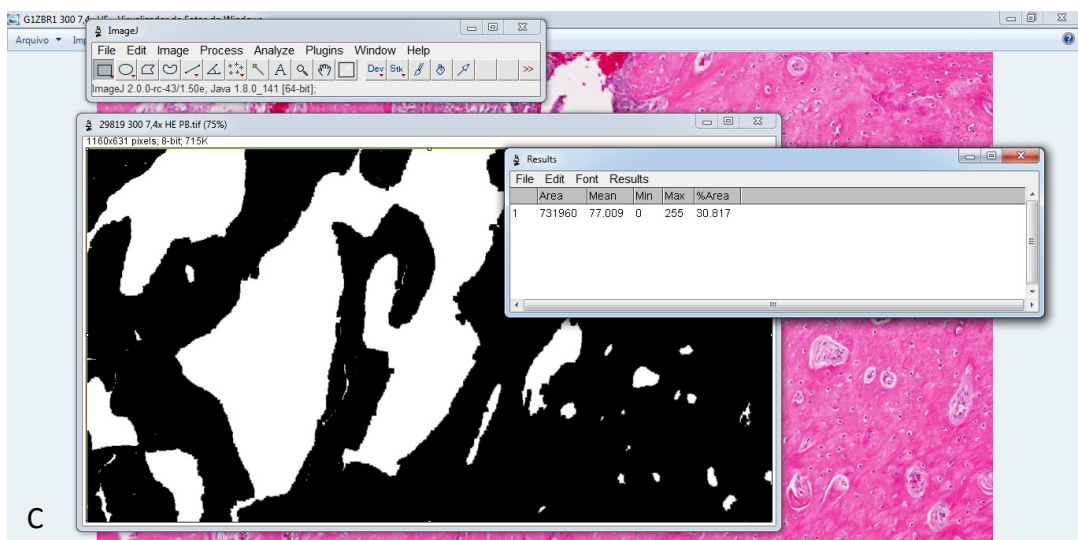
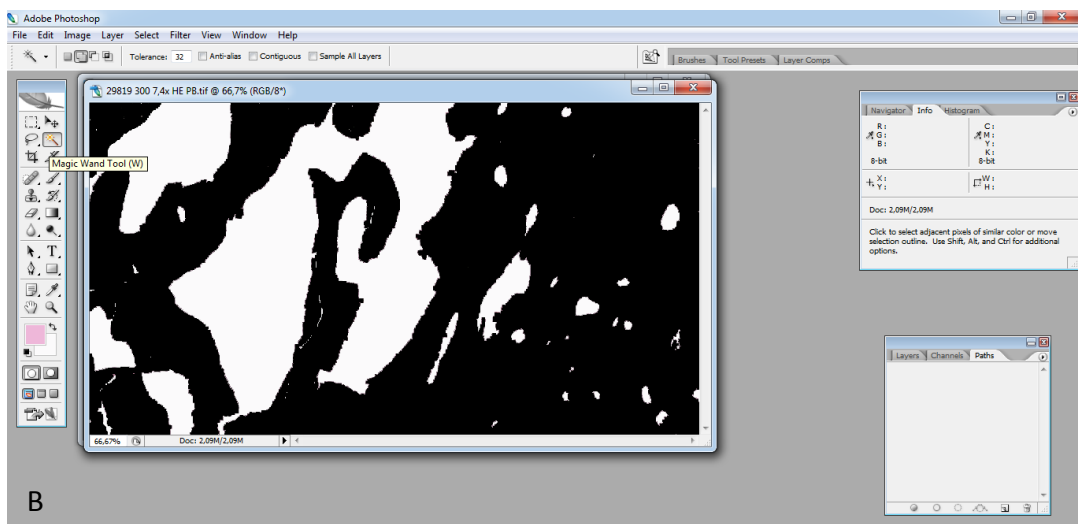
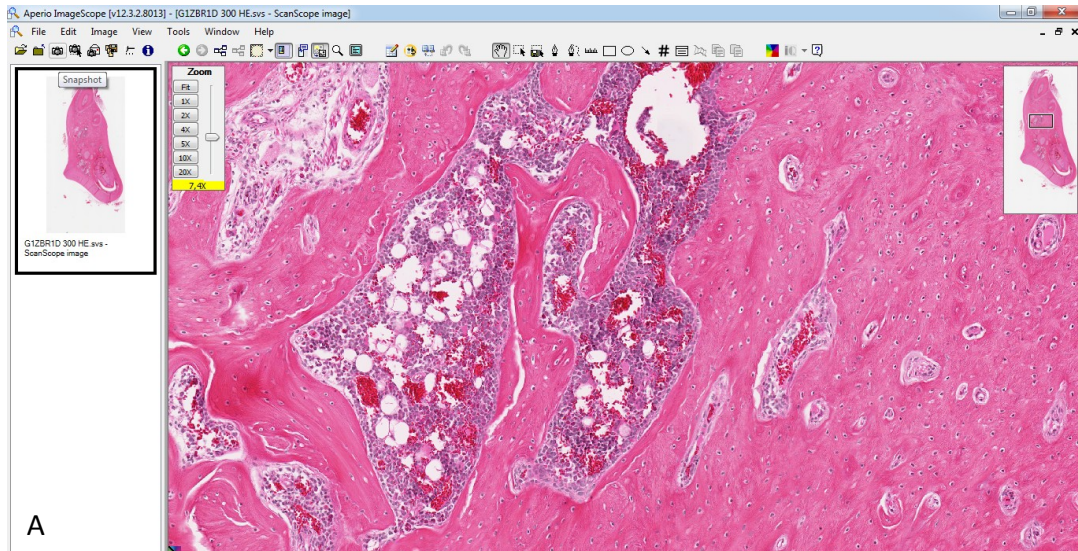


Figura 4 Análise da densidade óssea volumétrica (BV/TV). A Seleção e fotografia do ROI, em aumento 7,4, no Aperio Image Scope *software*. B Photoshop *software*: imagem mascarada em preto e branco. C Análise da imagem no programa Image J.

4.7.2 Contagem de osteoclastos

O segundo parâmetro de análise quantitativa foi a contagem de osteoclastos, que foi feita no programa Aperio ImageScope *versão 12.3.2.8013* em lâminas coradas por TRAP, aumento 20x. Os osteoclastos foram contados em dois cortes histológicos presentes em uma mesma lâmina. Em seguida, foi feita a média aritmética entre os valores obtidos na contagem desses dois cortes.

A contagem foi feita no espaço compreendido entre o nervo alveolar inferior e a crista óssea alveolar (Figura 3B). Além da contagem do número total de osteoclastos, eles foram classificados como aderidos ou não-aderidos à superfície óssea (47, 137). Somente foram considerados como osteoclastos não-aderidos aqueles que estavam evidentemente distantes da superfície óssea. Também foi feita a análise da morfologia dessas células e foi feita a contagem daquelas que apresentavam discrepância de tamanho em relação às demais. Essas células que apresentaram tamanho maior em relação às outras foram classificadas como células grandes e células gigantes, que eram muito mais amplas que as células classificadas como grandes.

4.7.3 Contagem de sinais de necrose (focos necróticos)

O terceiro parâmetro quantitativo foi a contagem dos sinais de necrose (focos necróticos), definidos como 5 ou mais osteoplastos vazios adjacentes por alguns autores (138, 158, 159) ou como 10 ou mais osteoplastos vazios por outros (24, 31, 160). Foram feitas as duas análises independentes, considerando as duas definições encontradas na literatura. Para tanto, foram selecionadas 3 lâminas por animal coradas em HE, localizadas em diferentes regiões do primeiro molar inferior (aproximadamente 800µm de distância entre os cortes). Foi feita a soma dos sinais de necrose, encontrados nesses três distintos cortes. Essa análise foi feita no programa Aperio ImageScope *versão 12.3.2.8013*. Foi utilizado aumento de 20x e em todas as três lâminas foi feita a análise de todo o tecido ósseo presente no corte histológico.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação da redução da adiposidade medular entre o grupo controle e o grupo experimental foi realizada após testes de qui-quadrado e exato de Fischer.

Para as variáveis quantitativas, inicialmente foi verificada se seguiam a distribuição normal por meio do teste de Shapiro-Wilk. Estas variáveis foram: percentual de espaço medular, BV/TV, número total de osteoclastos, número de osteoclastos aderidos, número de osteoclastos grandes e número de focos de necrose óssea (considerando cinco ou mais lacunas vazias). Para estas variáveis supracitadas foi utilizado o teste paramétrico t de Student para análise das diferenças entre os grupos controle e experimental.

As variáveis que não seguiram distribuição normal foram; número de osteoclastos não aderidos, número de osteoclastos gigantes e número de focos de osteonecrose (considerando dez ou mais lacunas vazias). Para estas variáveis foi utilizado o teste não-paramétrico Mann-Whitney para análise das diferenças entre os grupos controle e experimental. Todas as análises foram realizadas no programa Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, Ok, Estados Unidos). Para todos os testes estatísticos, um p-valor menor que 0,05 foi considerado como estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

Durante o experimento, houve a perda de quatro animais e a exclusão de quatro animais do estudo (154). Assim, a análise histológica foi feita nas hemimandíbulas do lado direito (que não foram submetidas à exodontia) de 32 ratos. Desses 32 animais, 18 pertenciam ao grupo Experimental e 14 ao grupo Controle.

5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Não foram observadas exposições ósseas ou quaisquer outras alterações infecciosas ou inflamatórias nos tecidos moles nas hemimandíbulas contralaterais à exodontia dos animais dos grupos controle e experimental.

5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA EM MICROSCÓPIA DE LUZ

Não foram observadas extensas áreas necróticas nos grupos experimental e controle. Entretanto, focos de necrose óssea, caracterizados por um conjunto de lacunas osteocíticas vazias adjacentes, foram constatados em ambos os grupos, e o grupo experimental aparentou conter maior quantidade desses focos em relação ao controle (por isso esse parâmetro também foi analisado quantitativamente, cujos resultados estão descritos adiante, na sessão correspondente).

Em relação à infecção, não foram encontrados sinais em ambos os grupos (Figura 5). A Figura 5 ilustra diferentes regiões de duas hemimandíbulas de animais pertencentes aos grupos controle e experimental – sulco gengival, dente, osso cortical, osso medular e osso alveolar – demonstrando ausência de colônias bacterianas. Os dois grupos (controle e experimental) também não apresentaram sequestro ósseo. Da mesma forma, também não foram encontrados sinais de infiltrado inflamatório tanto no grupo controle (Figura 6A) quanto no grupo experimental (Figura 6B), conforme representado pela Figura 6, que ilustra tecido gengival.

A reação periosteal foi observada em 3 animais do grupo experimental, conforme exemplificado na figura 7 (7C e 7D) e em nenhum animal do grupo controle (Figuras 7A e 7B). Esse achado pode ser descrito como uma formação

óssea sobre o osso cortical. Nesses animais, a reação periosteal foi formada por osso trabecular e estava localizada na região inferior da base da mandíbula com discreta extensão para a porção inferior da cortical vestibular. O limite entre osso cortical e reação periosteal era nítido.

Foram verificadas variações na adiposidade da medula óssea. Treze animais do grupo experimental (72,2%) exibiram redução de adipócitos, enquanto os demais animais desse grupo e os do grupo controle demonstraram presença significativa de adipócitos. Pela análise do teste do Qui-quadrado e teste exato de Fischer, verificou-se que esta diferença na adiposidade medular foi significativa entre os grupos controle e experimental ($p < 0,05$). Pela Figura 8, pode-se notar a acentuada redução na adiposidade medular (8C e 8D) no grupo experimental, quando comparada ao grupo controle (8A e 8B). A Figura 9 expressa a variação dessa infiltração gordurosa entre uma hemimandíbula do grupo controle (9A) quando comparada a hemimandíbulas de três diferentes animais do grupo experimental (9B, 9C e 9D).

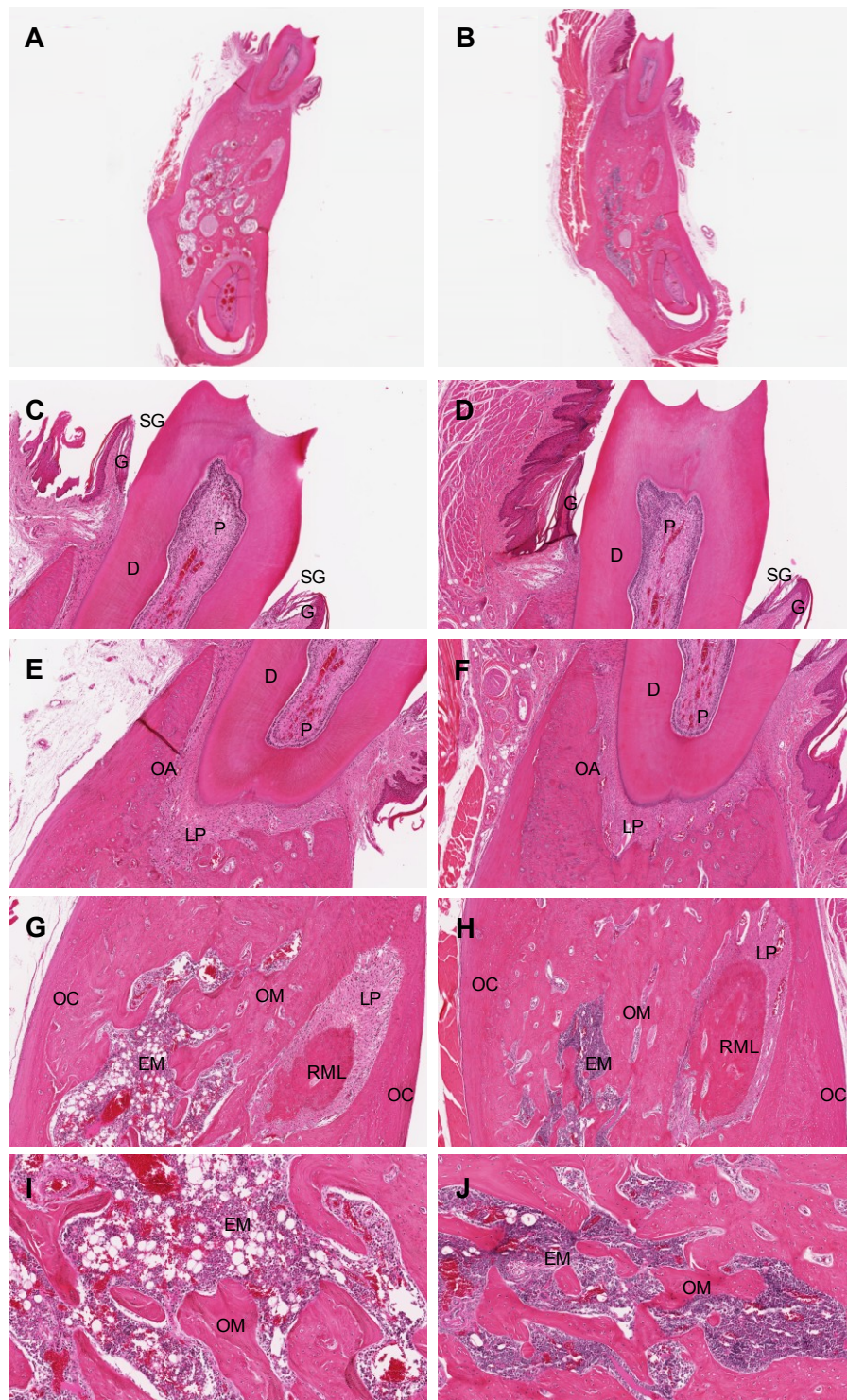


Figura 5 Cortes de hemimandíbulas de ratos dos grupos controle e experimental. Coloração HE. Nota-se ausência de infecção tanto no grupo controle, à esquerda (A, C, E, G, I) quanto no experimental, à direita (B, D, F, H, J). Sulco gengival (C, D), osso alveolar e regiões cervical e de furca do primeiro molar inferior (E, F), osso cortical, osso alveolar e raiz méso-lingual do primeiro molar inferior esquerdo (G, H) e osso medular (I, J). Descrição: G: gengiva; SG: sulco gengival; D: dentina; P: polpa; OA: osso alveolar; LP: ligamento periodontal; OC: osso cortical; OM: osso medular; EM: espaço medular; RML: raiz méso-lingual. Aumento 0,7x (A, B), 5x (C-H) e 10x (I-J).

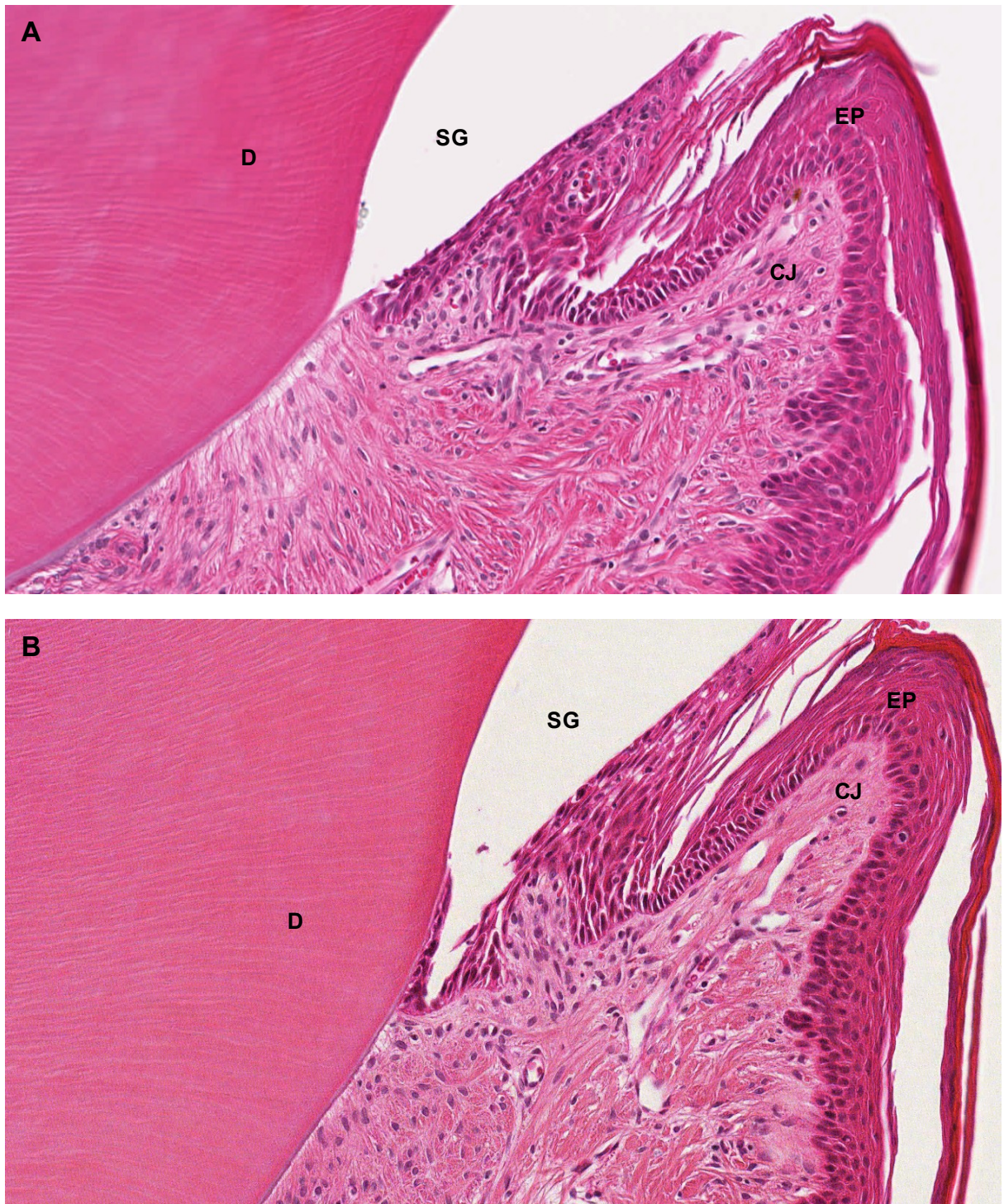


Figura 6 Tecido gengival de hemimandíbulas dos grupos controle e experimental. Coloração HE. Nota-se ausência de infiltrado inflamatório tanto no grupo controle (A) quanto no grupo experimental (B). As imagens correspondem à gengiva (E: epitélio; CJ: conjuntivo), ao sulco gengival (SG) e à dentina (D). Aumento 20x.

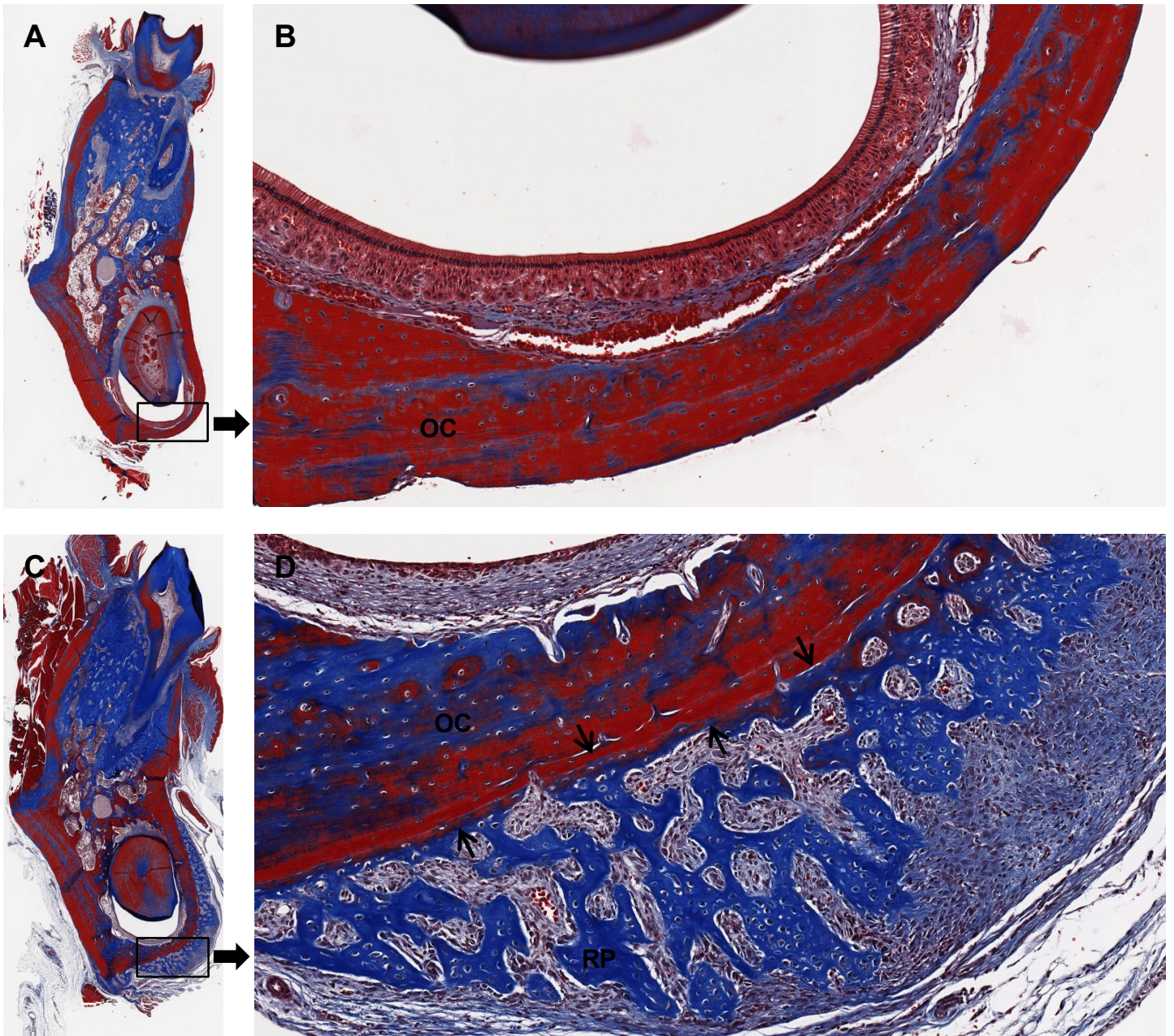


Figura 7 Reação periosteal. Coloração Tricromo de Masson. Osso cortical com ausência de reação periosteal (B) em hemimandíbula de animal do grupo controle (A, B). Presença de reação periosteal sobre o osso cortical (D) em uma hemimandíbula de animal do grupo experimental (C, D). Nota-se o nítido limite entre osso cortical e reação periosteal, conforme indicado pelas setas (D). Descrição: OC: osso cortical; RP: reação periosteal. Aumento 0,7X (A, C) e 10x (B, D).

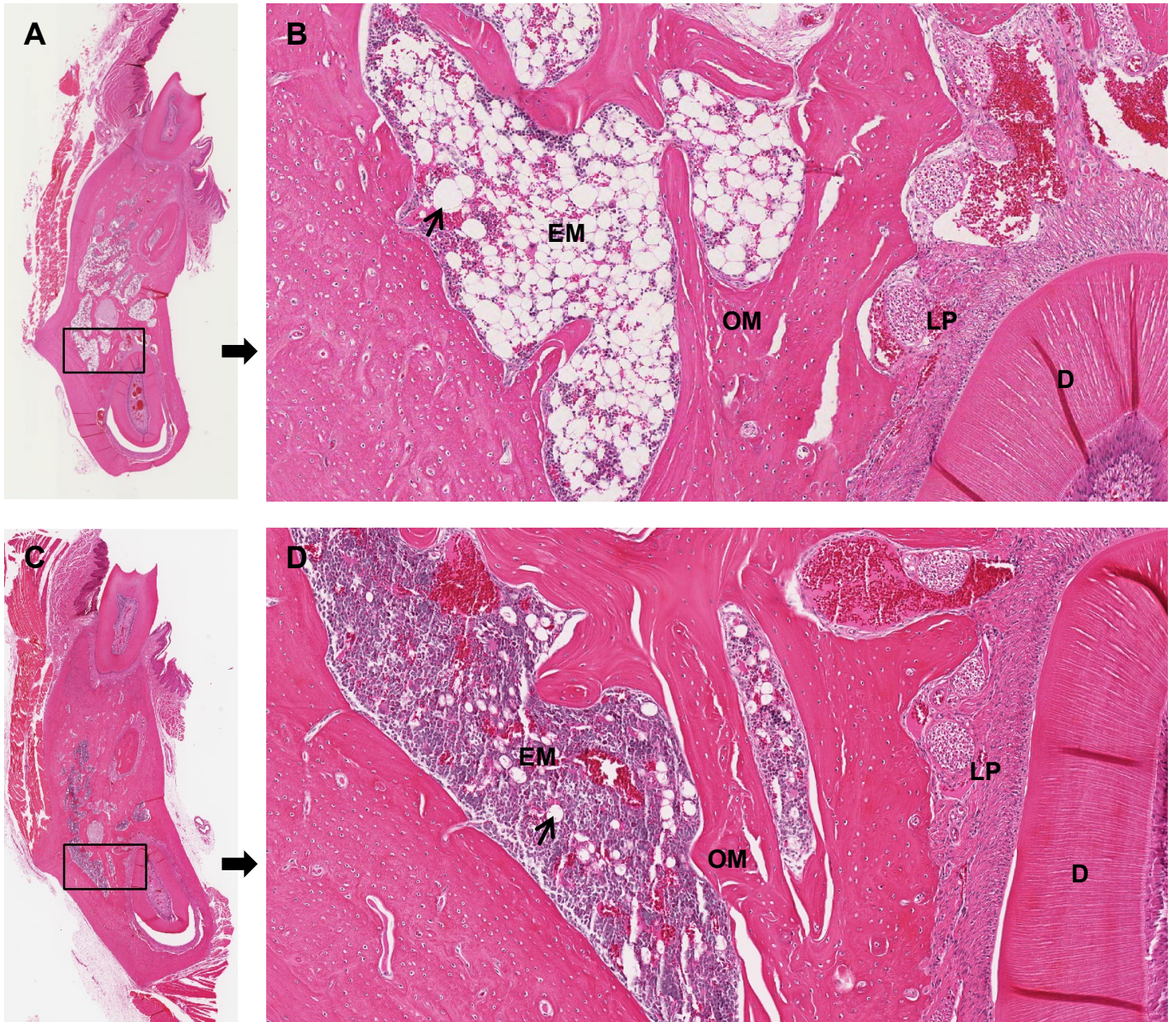


Figura 8 Adiposidade medular. Coloração HE. Presença significativa de adipócitos nos espaços medulares de hemimandíbula de animal pertencente ao grupo controle (A, B). Redução adipócitos em hemimandíbula de animal pertencente ao grupo experimental (C, D). Descrição: EM: espaço medular; OM: osso medular; LP: ligamento periodontal; D: dentina do incisivo; as setas apontam para os espaços correspondentes aos adipócitos. Aumento 0,7x (A, C) e 8x (B, D).

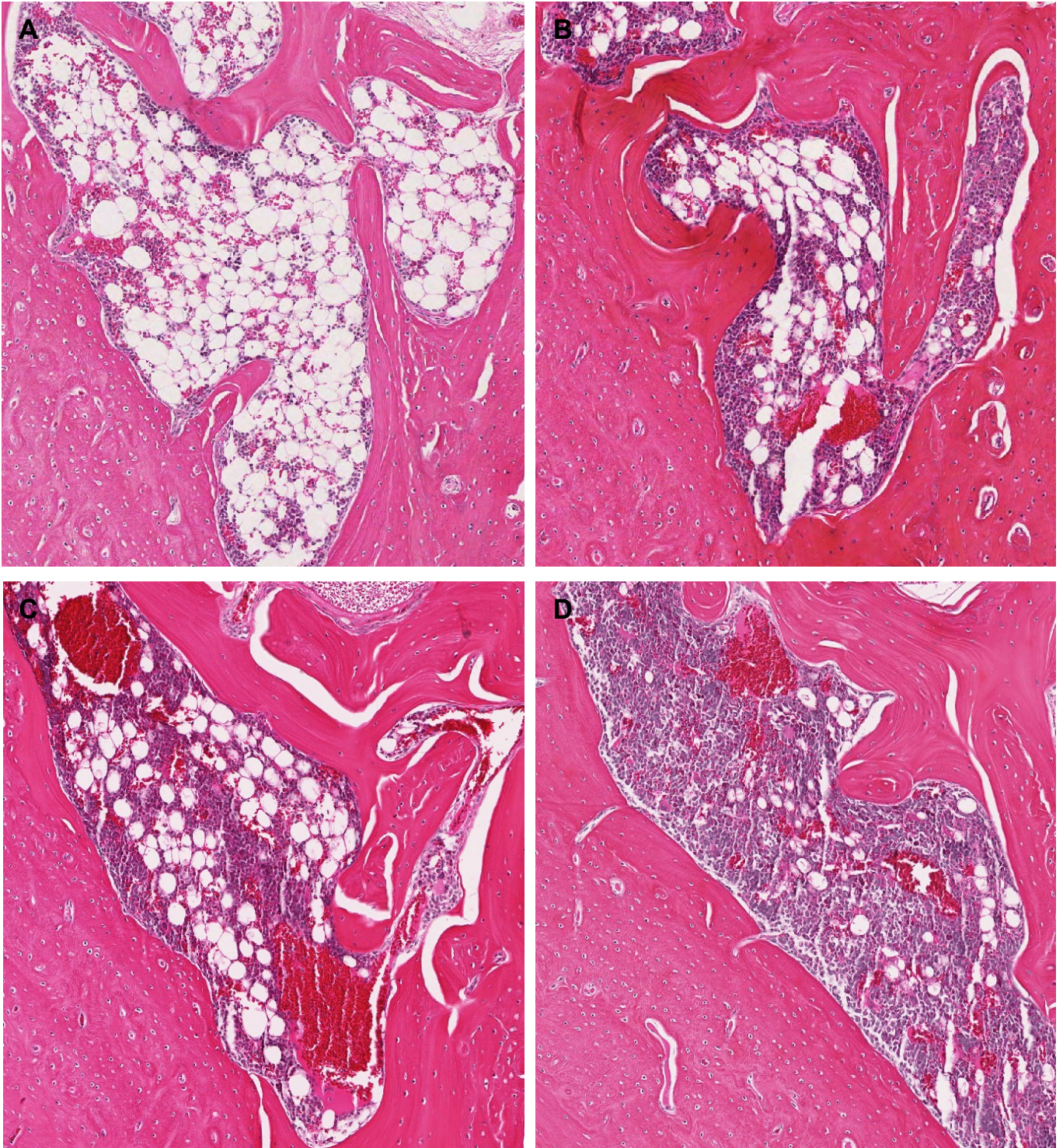


Figura 9 Variação da adiposidade medular. Coloração HE. Nota-se maior quantidade de adipócitos em hemimandíbula de animal do grupo controle (A) quando comparada a hemimandíbulas de animais pertencentes ao grupo experimental (B, C, D). Aumento 8x.

5.3 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

5.3.1 Avaliação da Densidade Óssea Volumétrica (BV/TV) e do percentual de espaço medular

A tabela 1 demonstra que houve um aumento significativo na densidade óssea volumétrica no grupo experimental, com consequente redução no espaço medular, conforme análise histomorfométrica. A Figura 10 apresenta dois exemplos de diminuição dos espaços medulares no grupo experimental (Figuras 10B e 10D) quando comparadas ao grupo controle (Figuras 10A e 10C).

Tabela 1 – Diferenças na densidade óssea volumétrica (BV/TV) e no percentual de espaço medular entre o grupo controle e o grupo experimental

	Grupo controle Média ± DP	Grupo experimental Média ± DP	p-valor
BV/TV (%)	40,67 ± 11,32	63,89 ± 12,69	<0,001*
Percentual espaço medular (%)	59,32 ± 11,32	36,10 ± 12,69	<0,001*

*p<0,05, significância estatística; Bv/TV = densidade óssea volumétrica; DP = desvio-padrão

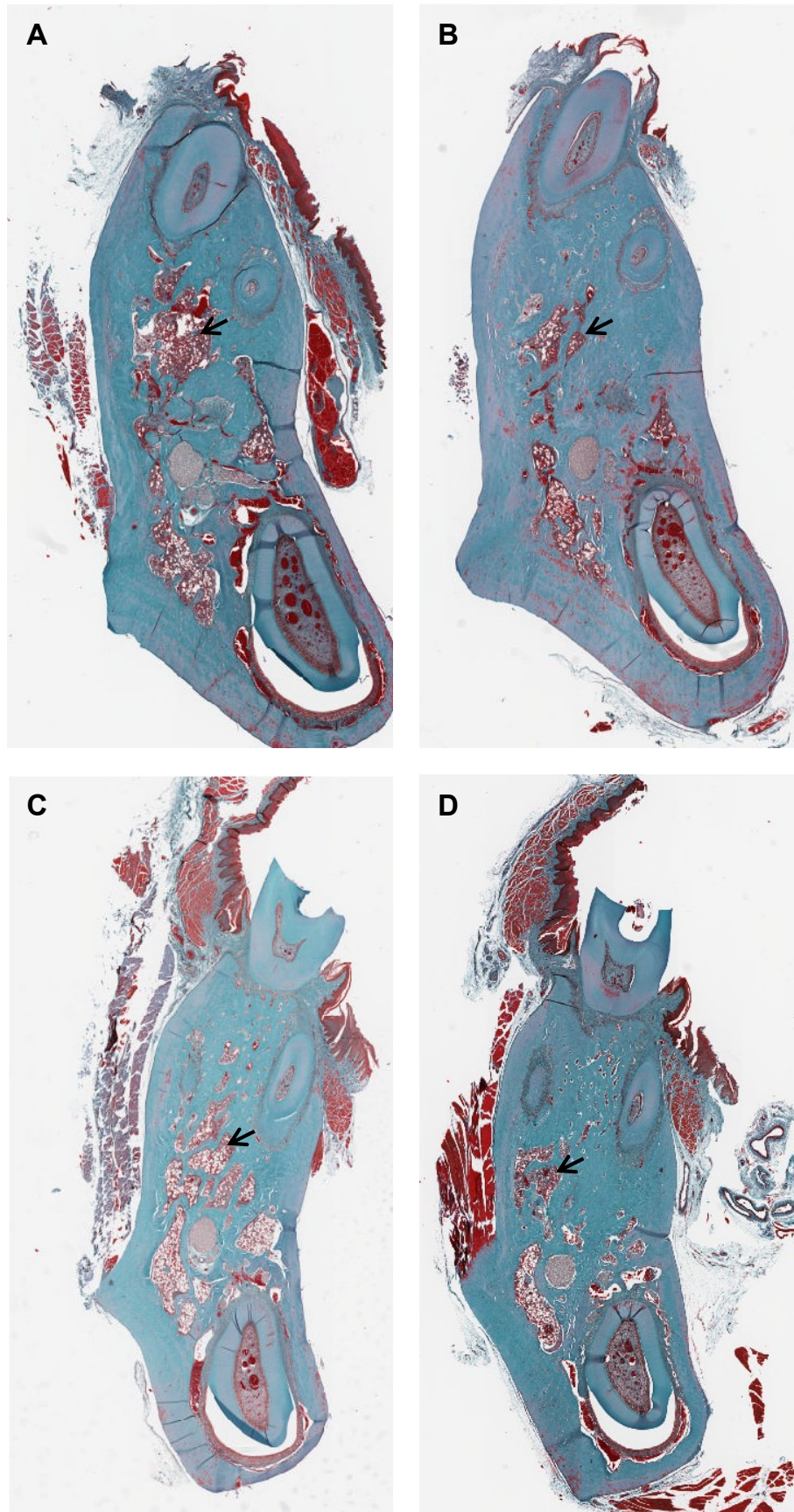


Figura 10 Densidade óssea volumétrica. Coloração Tricromo de Goldner. Nota-se redução do espaço medular em hemimandíbulas de animais do grupo experimental (B, D) em relação ao grupo controle (A,C). As setas apontam para os espaços medulares. Aumento 0,7x.

5.3.2 Contagem de Osteoclastos

A contagem de osteoclastos foi realizada após a aplicação da metodologia TRAP. A tabela 2 demonstra que não houve diferença no número de osteoclastos entre os grupos controle e experimental. Quando analisados separadamente os osteoclastos aderidos e não aderidos, esta diferença também não foi significativa. No entanto, o grupo experimental apresentou um número significativamente maior de osteoclastos considerados grandes e gigantes. As Figuras 11, 12 e 13 ilustram osteoclastos corados por TRAP, incluindo aderidos e não-aderidos, grandes e gigantes (Figuras 11, 12, 13)

Tabela 2 – Diferenças no número de osteoclastos entre o grupo controle e o grupo experimental, seguindo metodologia TRAP

	Grupo controle Média ± DP	Grupo experimental Média ± DP	p-valor
N total de osteoclastos	55,39 ± 18,26	55,05 ± 14,06	0,953
N de osteoclastos aderidos	53,32 ± 17,89	51,61 ± 13,19	0,758
N de osteoclastos não aderidos	2,07 ± 1,60	3,44 ± 3,26	0,228
N de osteoclastos grandes	2,07 ± 2,04	7,08 ± 3,26	<0,001*
N de osteoclastos gigantes	0,25 ± 0,47	1,66 ± 1,68	0,001*

*p<0,05, significância estatística; N = número; DP = desvio-padrão

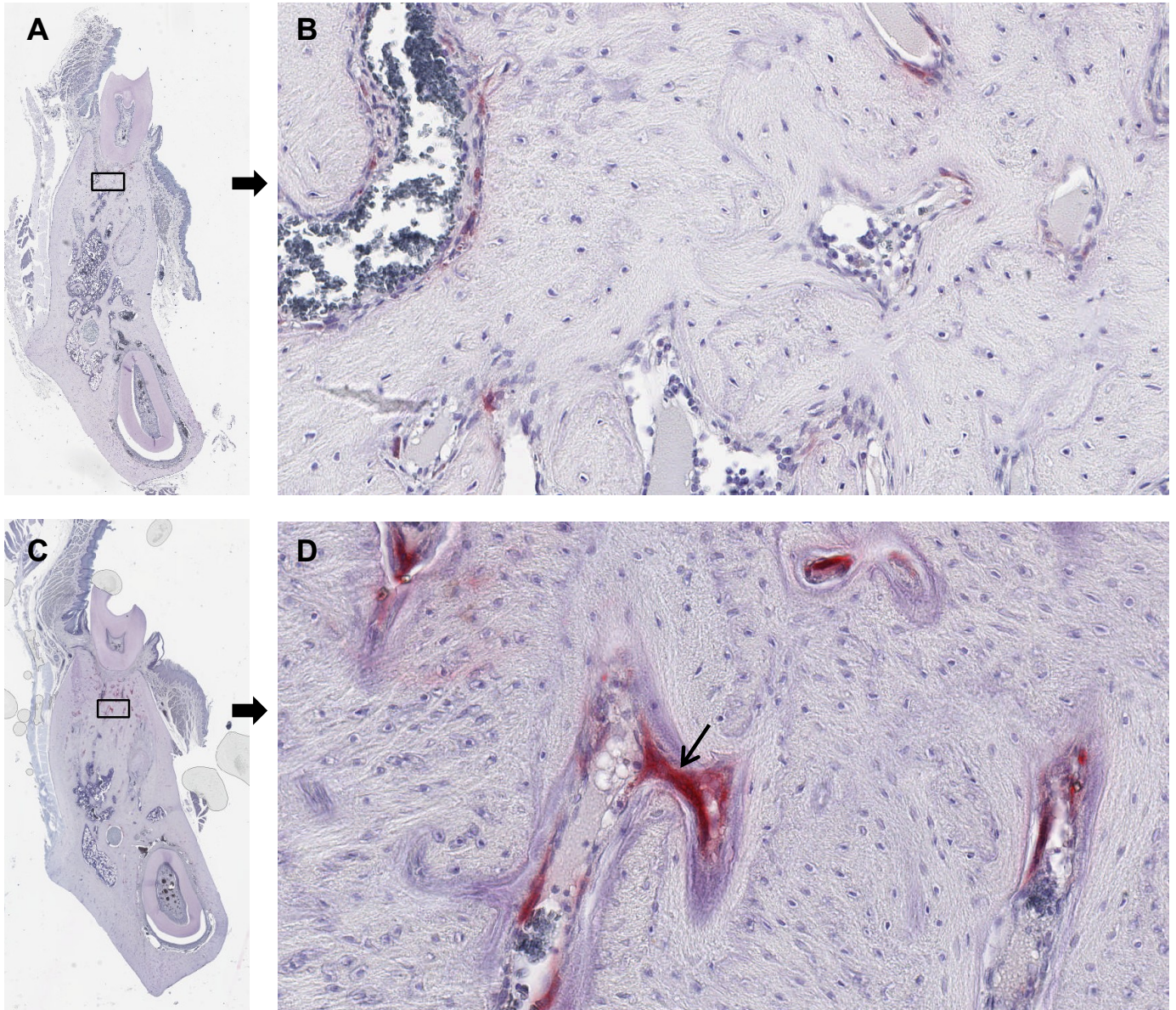


Figura 11 Processo alveolar em hemimandíbulas do grupo controle (A, B) e do grupo experimental (C, D). Histoenzimologia TRAP. Os osteoclastos estão corados em vermelho e a seta indica um osteoclasto gigante aderido à superfície óssea (D). Aumento 0,7x (A, C) e 20x (B, D).

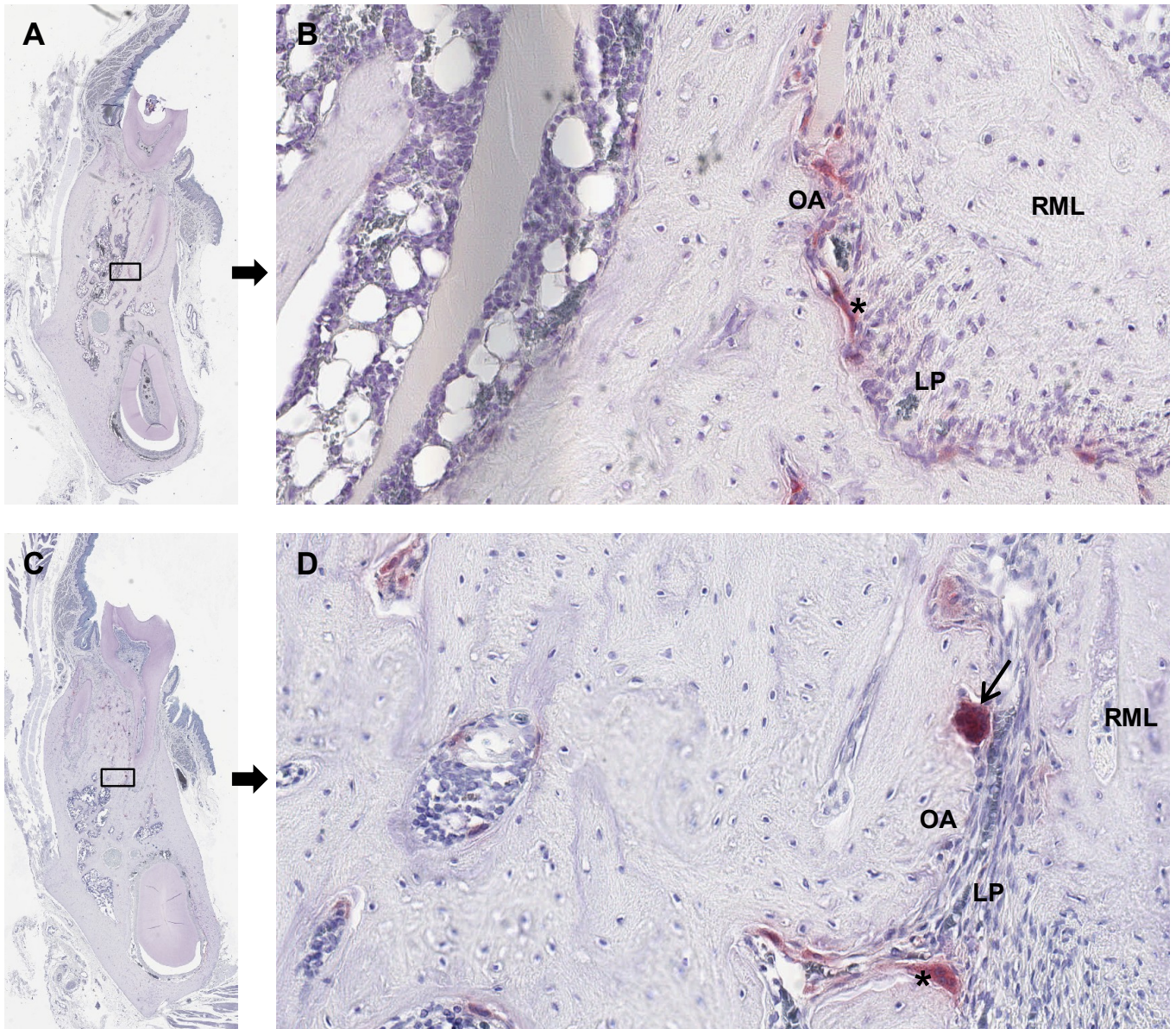


Figura 12 Osso alveolar na região da raiz méso-lingual dos grupos controle (A, B) e experimental (C, D). Histoenzimologia TRAP. Nota-se os osteoclastos corados de vermelho. A seta indica um osteoclasto gigante enquanto os asteriscos, osteoclastos grandes. Todos os osteoclastos dessas imagens foram considerados aderidos à superfície óssea. Descrição: OA: osso alveolar; LP: ligamento periodontal; RML: raiz méso-lingual do primeiro molar inferior. Aumento 0,7x (A, B) e 20x (B, D).

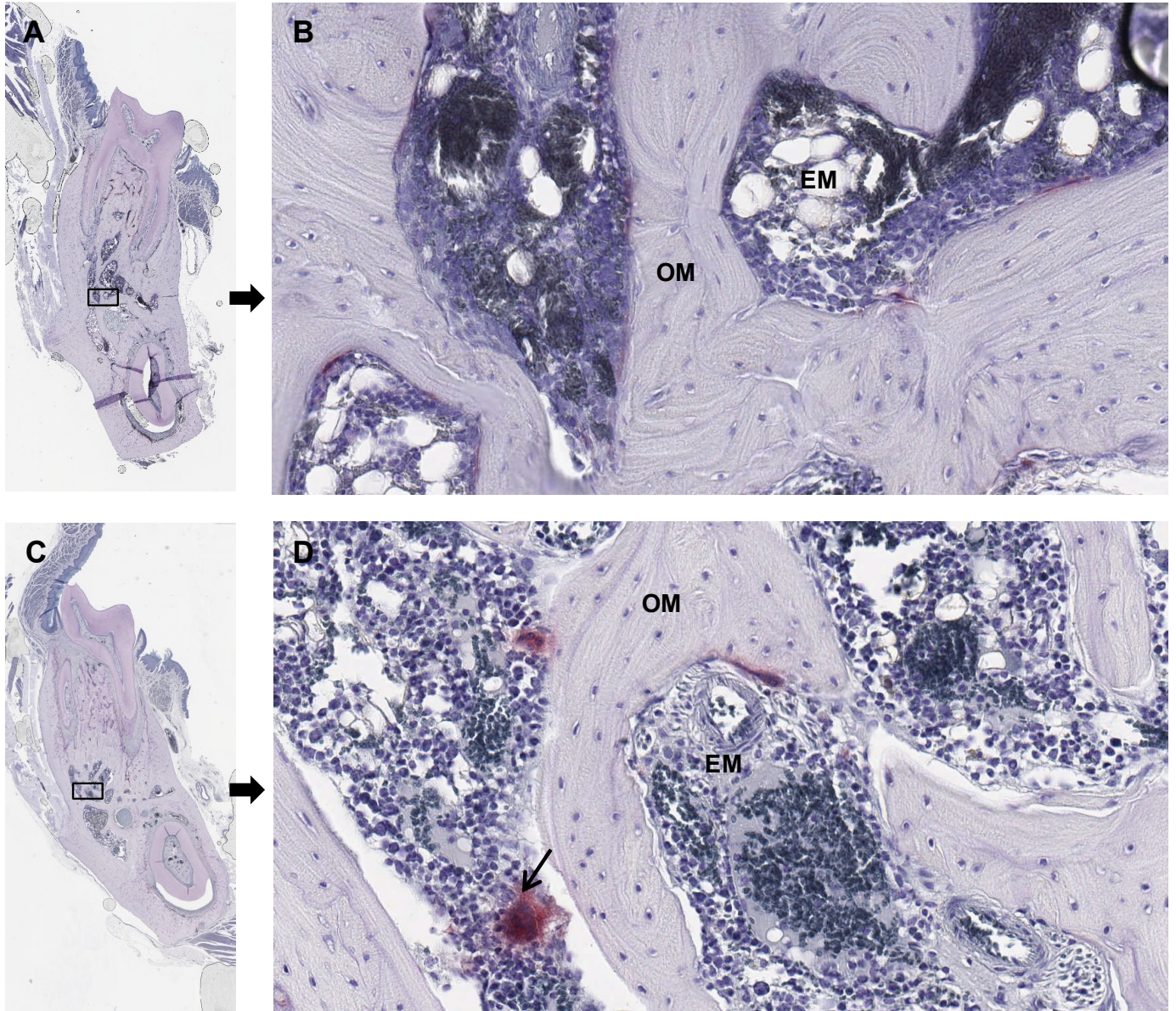


Figura 13 Osso medular no grupo controle (A, B) e experimental (C, D). Histoenzimologia TRAP. Nota-se osteoclastos corados de vermelho e a seta indica um osteoclasto gigante não-aderido à superfície óssea em D. Esse osteoclasto apresenta núcleo picnótico com falta de aderência, sugestivo de apoptose (28). Descrição: OM: osso medular; EM: espaço medular. Aumento 0,7x (A, C) e 20x (B, D).

5.3.3 Contagem de sinais de necrose

O grupo experimental apresentou maior quantidade de focos de necrose óssea (sinais de necrose) do que o grupo controle, considerando ambas as definições de foco de necrose, ou seja, 5 ou 10 lacunas osteocíticas vazias adjacentes (Tabela 3). A Figura 14 ilustra o tecido ósseo de hemimandíbulas de animais pertencentes a ambos os grupos (Figura 14)

Tabela 3 – Diferenças no número de focos de necrose entre o grupo controle e o grupo experimental

	Grupo controle Média ± DP	Grupo experimental Média ± DP	p-valor
Foco de necrose (5 ou mais lacunas)	10,28 ± 4,32	18,28 ± 10,97	0,01*
Foco de necrose (10 ou mais lacunas)	1,21 ± 1,18	5,39 ± 4,60	0,001*

*p<0,05, significância estatística; DP = desvio-padrão

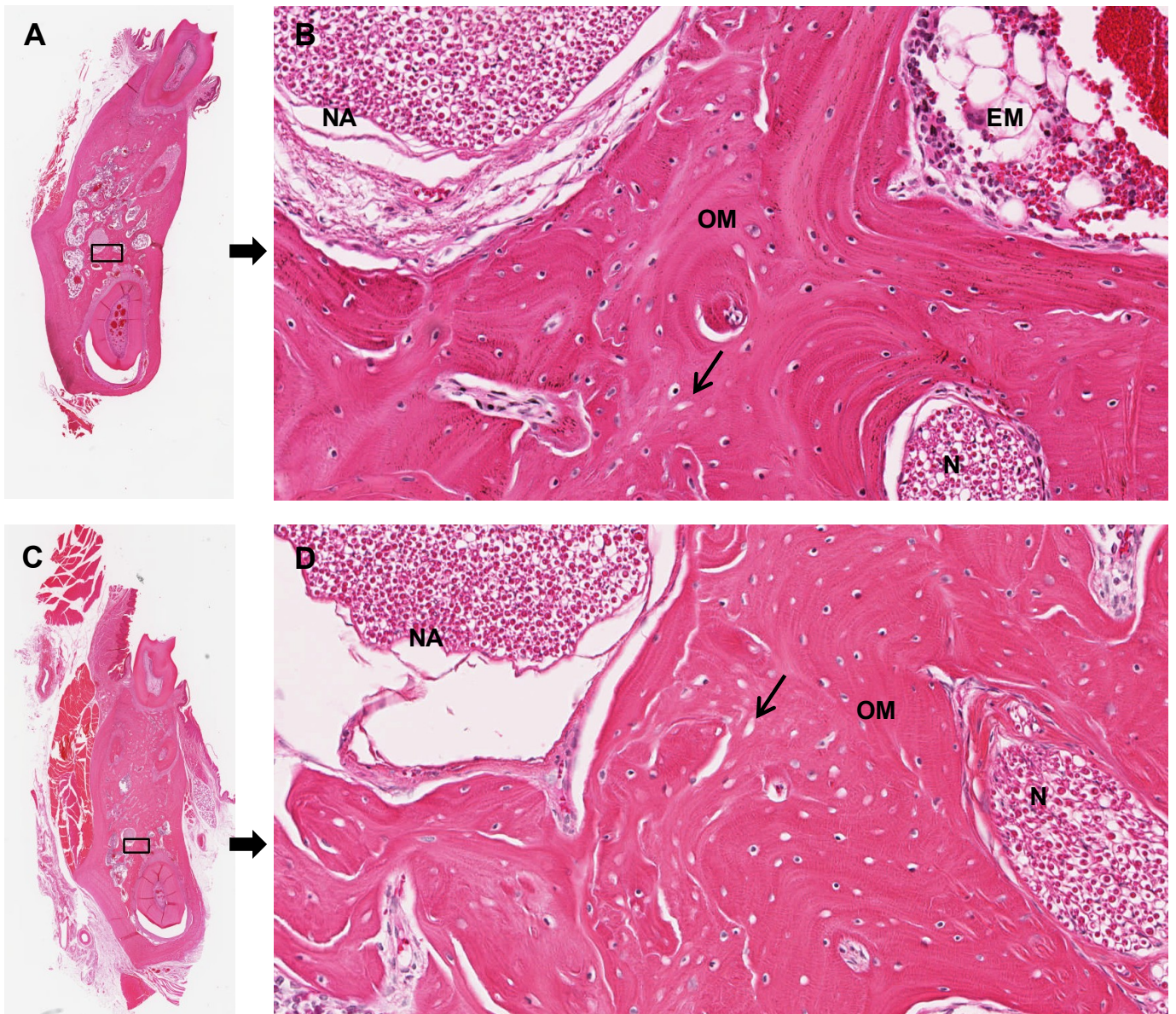


Figura 14 Tecido ósseo próximo ao nervo alveolar inferior em hemimandíbulas de animais do grupo controle (A,B) e experimental (C, D). Coloração HE. Há maior quantidade de osteoplastos vazios adjacentes (focos de necrose) no grupo experimental (D) em relação ao controle (B). Descrição: NA: nervo alveolar inferior; OM: osso medular; EM: espaço medular; N: nervo. As setas apontam para osteoplastos vazios, ou seja, sem osteócitos. Aumento 0,7x (A, C) e 20x (B, D).

6 DISCUSSÃO

Esse estudo demonstrou que, mesmo na ausência de exposição óssea e de trauma, que sucederam apenas no lado contralateral ao de análise, a administração de ácido zoledrônico foi suficiente para induzir alterações histológicas em hemimandíbulas de ratos. Dentre os principais achados destacam-se redução da adiposidade medular, aumento da densidade óssea volumétrica, variações morfológicas nos osteoclastos e maior quantidade de focos de necrose óssea. Não foi constatada a presença de extensas áreas necróticas, sequestro ósseo, infiltrado inflamatório e infecção. No entanto, a ação do ácido zoledrônico pode ser verificada no sítio contralateral ao da exodontia.

A análise histológica desse estudo foi feita em hemimandíbulas de animais tratados com bisfosfonato, no grupo experimental, e sem medicação, no grupo controle, ambas sem associação com um trauma específico, como a exodontia. Nessas hemimandíbulas não foram observadas exposições ósseas. Outros trabalhos descritos na literatura também avaliaram o efeito da administração desses fármacos via intraperitoneal, na ausência de procedimentos cirúrgicos e/ou outros fatores de risco em ratos e camundongos. Nesses modelos animais, a osteonecrose clínica, caracterizada por osso exposto na cavidade bucal, não foi observada (4, 24, 35, 36, 51). Apesar de não haver trauma e osso exposto, esses modelos detectaram, de alguma forma, alterações microtomográficas e/ou histopatológicas provocadas pela medicação. Isso sugere que, de acordo com o que foi encontrado em nossos resultados, os bisfosfonatos apresentam potencial de induzir modificações no tecido ósseo mesmo que a osteonecrose não seja detectada clinicamente e na ausência de fatores de risco. Essas alterações serão pormenorizadas ao longo desse capítulo de discussão.

Em relação à exposição óssea, em um trabalho desenvolvido em cães, foram administrados alendronato via oral e dexametasona, sem exodontia, e a exposição de osso não foi verificada (133). Em contraste, em um estudo com *minipigs*, a exposição óssea foi detectada em animais tratados com ácido zoledrônico, tanto naqueles que não foram submetidos a tratamento cirúrgico quanto no sítio contralateral à extração dentária. Os autores creditaram a ocorrência das exposições ósseas não decorrentes de trauma principalmente a infecções periodontais e

concluíram que a exodontia não é obrigatória para a indução da MRONJ (53). Porém, a maioria dos modelos animais descritos na literatura que induziram clinicamente a osteonecrose submetem os animais à extração dentária, que atuou como “gatilho” para a manifestação da doença (30 - 33). Essas diferenças quanto à exposição óssea podem ser justificadas possivelmente por variações metodológicas, como dosagens dos fármacos, vias de administração, período entre o trauma/início da administração das medicações e a eutanásia, espécie de animal utilizado na pesquisa, entre outros.

Nesse estudo também não foram observados infiltrado inflamatório, sequestro ósseo e infecção, em consonância com outros modelos animais que adotaram metodologias semelhantes, ou seja, com administração de bisfosfonatos sem trauma e sem exposição óssea (4, 24, 36, 51). A maioria dos modelos que detectaram essas características apresentou exposição óssea concomitante (41, 48).

Três animais do grupo experimental apresentaram reação periosteal, que consiste em uma reação do osso cortical a algum possível insulto, como medicações e infecções (161). A reação periosteal é um achado frequente em radiografias e tomografias computadorizadas de pacientes diagnosticados com MRONJ (135, 162), bem como em análise histopatológica de espécimes provenientes de pacientes com estágios mais graves da osteonecrose (26). Um estudo avaliou exames de imagem de 30 pacientes diagnosticados com estágio 0 de MRONJ e não detectou reação periosteal. Nessas circunstâncias, esse achado parece estar mais relacionado com casos avançados da doença (163).

Alguns modelos animais constataram a presença de reação periosteal que em geral estava adjacente a áreas de exposição óssea com ou sem extração dentária (53) e doença periodontal, nesse caso próximo às regiões necróticas (138). Em nosso modelo, apenas três animais do grupo experimental apresentaram essa alteração e a diferença não foi estatisticamente significativa. Como nessas hemimandíbulas não havia presença de focos de infecção e infiltrado inflamatório, nem exposição de osso, a reação periosteal pode ter sido uma resposta à presença de bisfosfonatos no tecido ósseo. Nesses animais, também havia quantidade considerável de sinais de necrose que podem ter interferido no processo.

Ainda sobre a análise qualitativa, esse estudo apresentou diferença estatisticamente significativa no parâmetro adiposidade da medula óssea amarela. As hemimandíbulas do grupo experimental apresentaram menor infiltração gordurosa do que as do grupo controle. Na literatura, existem abordagens, inclusive com modelos animais, sobre a interação entre adiposidade e bisfosfonatos. Entretanto, em nossa revisão de literatura, esse achado não foi encontrado em modelos animais de estudo de MRONJ. Algumas pesquisas foram desenvolvidas na tentativa de melhor elucidar a relação entre adipogênese e doenças osteolíticas como, por exemplo, a osteoporose, bem como do efeito de bisfosfonatos nesse cenário (112, 116, 164, 165).

Nesse contexto, em 2011 foi publicado um estudo que analisou biópsias transilíacas de pacientes com osteoporose antes e depois do tratamento com risendronato ou placebo. Foi constatada a redução do volume e do número de adipócitos nos espécimes coletados de mulheres que fizeram o tratamento com o bisfosfonato. Nas amostras de pacientes que fizeram uso de risendronato, também foi observada, por imunocoloração, a redução da expressão do PPAR γ 2 (receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama 2) nas células da medula. O PPAR γ 2 é um fator de transcrição da adipogênese e os autores sugeriram que o bisfosfonato provavelmente induziu a diminuição da quantidade de adipócitos devido à sua possível influência na via da adipogênese através da redução da expressão do PPAR γ 2 (164). Em 2015, outro trabalho demonstrou, por meio de ressonância magnética, redução da adiposidade na medula óssea em vértebras de pacientes com osteoporose tratadas com uma única infusão anual de ácido zoledrônico em comparação com as que não fizeram esse tratamento. Nessas pacientes, também foi verificado aumento da densidade mineral óssea (116). Esses achados, apesar da diferença metodológica e do tipo de estudo, apresentam semelhança com os resultados do nosso modelo animal, que revelaram redução da infiltração gordurosa medular e aumento da fração de volume ósseo na presença de bisfosfonato.

Em um modelo animal de indução de osteoporose por meio da retirada dos ovários de camundongos, os autores observaram aumento da quantidade de gordura medular nesses animais quando comparados aos do grupo controle e concluíram que a adipogênese na medula ocorre em sincronia com a deterioração da microarquitetura trabecular (165). Esse processo parece ser revertido na

presença de bisfosfonatos, conforme demonstrou um modelo no qual ratos ovariectomizados que receberam uma única dose de ácido zoledrônico apresentaram diminuição da adiposidade e da perda óssea quando comparados a ratos ovariectomizados que não receberam a medicação e manifestaram perda óssea concomitante ao aumento de adipócitos na medula. Como osteoblastos e adipócitos apresentam um precursor em comum, que são as células tronco mesenquimais, os autores também sugeriram que o ácido zoledrônico estimula a osteogênese e reduz a diferenciação adipogênica, já que observaram por meio de análise de PCR em tempo real diminuição da expressão gênica do PPAR γ 2 (112).

Apesar de esses estudos apresentarem objetivos e metodologias diferentes em relação a nosso modelo e concentrarem em patologias distintas – osteoporose e MRONJ – os resultados direcionam a um ponto de convergência em comum, que é a redução da adiposidade medular possivelmente provocada pelos bisfosfonatos. As células-tronco mesenquimais são precursoras tanto de osteoblastos quanto de adipócitos e alguns autores apontaram a necessidade de mais investigações sobre a provável relação inversa entre a adipogênese e osteogênese a fim de esclarecer o impacto desse cenário em desordens ósseas (115). A significância dos achados do nosso estudo concentra principalmente nonexo entre aumento do volume ósseo e redução da adiposidade, de acordo com outros trabalhos já mencionados. Embora o efeito dos bisfosfonatos sobre a adiposidade medular não tenha sido citado como fator contribuinte para o desenvolvimento da osteonecrose, o presente modelo animal indica uma possibilidade de que esse processo possa interferir de alguma maneira na patogênese da MRONJ. Entretanto, essa premissa, ainda imatura, necessita de mais evidências.

Como relatado, a densidade óssea volumétrica (BV/TV) apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimental e controle. Outros modelos descritos na literatura também encontraram resultados equivalentes. Alguns deles adotaram metodologia semelhante à nossa, ou seja, ausência de trauma e exposição óssea, e os resultados foram constatados por meio de análise histológica (4) e/ou microtomográfica (4, 51). Outros estudos também relataram achado similar, ainda que associados a exodontias e lesões perioapicais (53, 136, 140). A confluência desses resultados pode ser atribuída ao efeito antirreabsortivo dos bisfosfonatos.

Durante o desenvolvimento do presente modelo animal, os ratos foram submetidos ao exame microtomográfico. Os resultados da microtomografia, descritos por Vilarinho et al., também demonstraram diferença estatisticamente significativa da densidade óssea volumétrica entre os grupos. Assim, nas hemimandíbulas contralaterais ao trauma, BV/TV foi maior no grupo experimental em relação ao grupo controle, corroborando os achados histomorfométricos descritos nessa dissertação (38, 154).

Em nosso modelo, não houve diferença no número de osteoclastos entre os grupos experimental e controle. Também não houve diferença estatisticamente significativa no número de osteoclastos aderidos ou não à superfície óssea. Um estudo avaliou a interferência do ácido zoledrônico no número de osteoclastos em maxilares de camundongos ao longo de até 6 meses de tratamento e também não encontrou variações (51). Esses achados foram semelhantes aos nossos. Entretanto, em geral, a contagem de osteoclastos em animais que receberam bisfosfonatos apresenta divergência na literatura. Muitos estudos que analisam esse parâmetro por meio de histologia apontaram diminuição da quantidade dessas células (31, 33, 36, 165). Quando analisados por meio de TRAP, alguns trabalhos também indicam redução de osteoclastos na presença de bisfosfonatos (48, 160). Em alguns, essa redução também é acompanhada de aumento do número de osteoclastos não-aderidos (47, 139). Outros, por sua vez, demonstraram aumento tanto dos não-aderidos quanto do número total dessas células (25, 136, 137). A não-aderência dos osteoclastos à superfície óssea na presença de bisfosfonatos possivelmente ocorre porque esses fármacos parecem induzi-los à apoptose (28).

Sobre as variações morfológicas, nosso estudo apontou maior quantidade de osteoclastos grandes e gigantes no grupo experimental em relação ao grupo controle e a diferença foi estatisticamente significativa. De forma similar, alguns modelos animais com administração de bisfosfonatos relataram essas alterações nos osteoclastos (136, 137, 139). Ademais, espécimes de pacientes com MRONJ analisados histopatologicamente também apresentaram osteoclastos maiores (26, 28, 167).

Os bisfosfonatos atuam na via do mevalonato e prejudicam a prenilação de proteínas que estão envolvidas na função celular, o que pode resultar na ruptura do citoesqueleto, acometendo a forma e a atividade dos osteoclastos, e indução a

apoptose. Além disso, o acúmulo de cálcio liberado durante a reabsorção é considerado um sinal importante para a morte osteoclástica. Como esses fármacos são antirreabsortivos, há redução da liberação de cálcio e, dessa forma, é possível que os bisfosfonatos prolonguem o tempo de vida dessas células e conseqüentemente a sua presença no osso, ainda que permaneçam disfuncionais. Inclusive, a contínua fusão de precursores aos osteoclastos aumenta o tamanho dessas células que, diante da redução do cálcio que é sinalizador apoptótico, perduram no tecido. (167). Essa conjectura pode justificar a alteração morfológica e a equivalência da quantidade de osteoclastos expressadas pelo grupo experimental em relação ao grupo controle em nosso modelo.

O último parâmetro de análise foi a contagem dos sinais de necrose, que foi maior no grupo experimental em relação ao grupo controle e a diferença foi estatisticamente significativa. Esses achados estão em conformidade com outros descritos na literatura, tanto considerando focos de necrose como 5 lacunas vazias adjacentes (138, 159) como 10 (16, 24, 31). Inclusive, alguns modelos animais exibiram esse resultado na ausência de trauma e exposição óssea (24, 35, 36), corroborando nossos resultados.

Em um estudo foi feita a administração de análogos fluorescentes de risendronato em camundongos e coelhos e foi observado que havia acúmulo desses fármacos nas lacunas osteocíticas, bem como nos canalículos vasculares do tecido ósseo (109). Considerando a influência dos bisfosfonatos sobre a remodelação óssea e seu potencial de toxicidade, há possibilidade de que a presença desses fármacos nas lacunas osteocíticas afetem de alguma forma os osteócitos, o que pode justificar o aumento dos focos necróticos no grupo experimental observados nesse trabalho. Ademais, em um modelo animal de indução de MRONJ associado à doença periodontal, os autores sugeriram que os bisfosfonatos parecem induzir apoptose aos osteócitos (117). Desse modo, esses achados podem auxiliar na compreensão dos resultados do nosso estudo, de forma que os bisfosfonatos possivelmente provocam aumento dos osteoplastos vazios através da indução dos osteócitos à apoptose .

Em nosso modelo, não foram observadas alterações gengivais, o que também foi demonstrado em um modelo desenvolvido em ratos com o objetivo de avaliar a progressão da osteonecrose nos tecidos mole e duro ao longo de 45 dias

de tratamento com ácido zoledrônico, no qual a gengiva evidenciou aspecto de normalidade enquanto o osso apresentou focos de necrose óssea (36). Esses achados são similares aos resultados encontrados em nosso estudo e ambos indicam que a presença de bisfosfonatos induz alterações no tecido ósseo prévias a uma potencial manifestação clínica da doença e apontam que o osso possivelmente é afetado por esses fármacos antes do tecido mole.

Como muitos aspectos da etiopatogenia da MRONJ ainda não foram esclarecidos, os modelos animais são uma alternativa viável para o estudo da doença. A análise microtomográfica fornece a oportunidade de avaliar as alterações de imagem induzidas por esses fármacos, tanto em estágios precoces quanto avançados da osteonecrose (38). Esses aspectos imaginológicos são importantes porque a MRONJ, em pacientes, configura uma entidade que nem sempre permite avaliação diagnóstica por outros meios, como análise histopatológica.

Entretanto, o estudo histopatológico da MRONJ é um dos caminhos que podem auxiliar no esclarecimento da patogênese da doença, uma vez que possibilitam analisar morfológicamente as alterações teciduais e celulares provocadas pelos bisfosfonatos. Além disso, permite a caracterização histopatológica da doença, o que contribui para a compreensão de vários aspectos clínicos e radiográficos da MRONJ. Como esse tipo de análise em pacientes é limitado, os modelos animais fornecem a oportunidade de avaliar histopatologicamente os efeitos dos bisfosfonatos em diferentes contextos, como na presença ou ausência de trauma, antes ou após a indução da doença, entre outros (29, 34).

A histomorfometria possibilita avaliar *in vivo* o metabolismo e a estrutura óssea e assim, pode contribuir para o estudo de desordens metabólicas através do monitoramento do efeito de drogas na remodelação e microarquitetura óssea. O uso de *softwares* otimiza a avaliação uma vez que contem ferramentas específicas para a análise histomorfométrica, que pode ser feita de forma manual ou automática (168). Nesse estudo foram utilizados principalmente *Image J* e *Aperio ImageScope*.

Os achados microtomográficos detectados no presente modelo animal também indicam alterações na microestrutura óssea provocadas pelo ácido zoledrônico antes da indução da MRONJ, em conformidade com a análise histopatológica, tanto que o parâmetro BV/TV foi significativamente maior no grupo

experimental em relação ao controle em ambas as análises (38). Esses resultados evidenciam as modificações que os bisfosfonatos podem provocar no tecido ósseo, anteriores à manifestação clínica da doença, e podem indicar uma possível influência desses fatores na patogênese da MRONJ.

Nessas circunstâncias os achados desse estudo podem reportar ao estágio 0, caracterizado por sinais clínicos e radiográficos inespecíficos, já que apresentam alterações microtomográficas na ausência de trauma e exposição, ratificados por achados histomorfométricos (38). A descrição histopatológica do estágio 0 em pacientes é restrita, uma vez que o trauma é um fator de risco importante que pode estimular a exposição óssea, o que reforça a importância dos modelos animais no estudo microscópico dessa condição. Há muitas limitações nesse pressuposto, a começar pela comparação entre animais e humanos, além do fato de que o estágio 0 também pode englobar sintomatologia, que não pode ser alegada por cobaias.

Esse estudo apresenta limitações. Dentre elas pode ser citada a dificuldade na determinação da região de interesse para análise histomorfométrica bem como na definição dos parâmetros da análise. Os modelos animais descritos apresentam variações metodológicas e analisam diferentes regiões, de forma que não há uma área específica indicada como ideal ou referência para a análise. Além disso, a mandíbula possui complexidade anatômica e não é fácil a seleção de áreas homogêneas, embora evitássemos englobar regiões com variações morfológicas. A heterogeneidade entre os estudos também dificulta a comparação entre os resultados.

Além disso, existem limitações inerentes à própria técnica histomorfométrica. A primeira é que, para fazer esta análise, é necessário o procedimento invasivo. Nesse estudo foram utilizados roedores, porém a aplicabilidade dessa técnica em pacientes com MRONJ em geral é improvável, por razões já citadas. A histomorfometria também tem a desvantagem de ser trabalhosa e demandar tempo. Ademais, como se trata da análise de um corte histológico, a histologia fornece informações sobre um segmento da amostra e não de toda a dinâmica do processo, mesmo com a análise de cortes seriados (168). Possibilita a descrição da morfologia em condições fisiológicas ou patológicas, mas em geral não revela os mecanismos por trás da apresentação morfológica dos tecidos.

Assim, uma vez que esse estudo demonstra alterações provocadas por bisfosfonatos prévias à manifestação clínica da doença, um dos desafios em relação à MRONJ é a detecção precoce das mudanças ósseas antes do surgimento da lesão propriamente dita. Por isso, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas na tentativa de encontrar um marcador sorológico ou radiológico que possam promover essa detecção (38, 169, 170).

Também é necessária uma melhor compreensão a respeito da patogênese da MRONJ que poderá fornecer respostas para as muitas dúvidas que ainda pairam sobre essa doença, que vão da etiopatogenia ao tratamento. Apesar das várias teorias que buscam elucidar os mecanismos que culminam na osteonecrose, o discernimento dessa condição também caminha com a evolução no conhecimento dos complexos e dinâmicos mecanismos que envolvem a fisiologia óssea (5).

7 CONCLUSÃO

As características histológicas clássicas encontradas em espécimes de pacientes com MRONJ tais como infecção, sequestros ósseos, infiltrado inflamatório, reação periosteal e extensas áreas necróticas, não foram observadas no modelo animal. Mas, de forma clara, foi possível detectar diferenças entre os grupos experimental e controle pela análise histopatológica e histomorfométrica. As alterações morfológicas encontradas sinalizam a ação da medicação sobre o tecido ósseo, ainda que na ausência de trauma, como extração dentária, e ainda que a doença não tenha sido diagnosticada clinicamente.

O aumento da densidade óssea volumétrica e do número de osteoclastos grandes e gigantes no grupo experimental, bem como a presença significativa dos focos de necrose (osteoplastos vazios adjacentes) sugerem redução da atividade reabsortiva e aumento da aposição de osso, configurando modificações na remodelação causadas pelo ácido zoledrônico. Também, no grupo experimental, houve diminuição da infiltração gordurosa possivelmente indicando que a medicação influencia na redução da adipogênese e aumento de volume ósseo. Esses mecanismos podem estar envolvidos na etiopatogenia da MRONJ.

Este trabalho mostra, corroborando dados da literatura, que, em hemimandíbulas de ratos, mesmo na ausência exposição óssea e de trauma como a extração dentária, o ácido zoledrônico promove alterações histopatológicas compatíveis com osteonecrose.

REFERÊNCIAS

1. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg.*2003;61(9): 1115-1117.
2. Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the Jaws Associated With the Use of Bisphosphonates: A Review of 63 Cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62(5): 527-534.
3. MesserJG, Calle JLM, Jiron JM, Castillo EJ, Poznak CV et al. Zoledronic acid increases the prevalence of medication-related osteonecrosis of the jaw in a dose dependent manner in rice rats (*Oryzomys palustris*) with localized periodontitis. *Bone.* 2018;108(1): 79-88.
4. Soares MQS, Dessel JV, Jacobs R, Santos PSS, Cestari TM et al. Zoledronic Acid Induces Site-Specific Structural Changes and Decreases Vascular Area in the Alveolar Bone. *J Oral Maxillofac Surg.* 2018;18(30220-9): 1-8.
5. George EL, Lin YL, Saunders MM. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a mechanobiology perspective. *Bone Reports.*2018;8(1): 104-109.
6. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T 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): 1938-1956.
7. El-Rabbany M, Sgro A, Lam DK, Shah PS, Azarpazhooh A. Effectiveness of treatments for medication-related osteonecrosis of the jaw: A systematic review and meta-analysis. *J Am Dent Assoc.* 2017;148(8): 584-594.
8. MCGowan K. Insufficient Evidence to Compare the Efficacy of Treatments for Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws. *J Evid Based Dent Pract.* 2018;18(1): 70-72.
9. Iglesias-Linares A, Yáñez-Vico RM, Reina ES, Lagares DT, Moles MAG. Influence of bisphosphonates in orthodontic therapy: Systematic review. *J Dent.* 2010;38(8): 603-611.
10. Rodolfo D, Saccucci M, Filippakos A, Gerxhani R, Lopez G et al. Effects of bisphosphonates in orthodontic therapy:systematic review. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2012;26(2): 29-33.

11. Krieger E, Jacobs C, Walter C, Wehrbein H. Current state of orthodontic patients under Bisphosphonate therapy. *Head Face Med.* 2013;9(10): 1-6.
12. Freitas NR, Lima LB, Moura MB, Guedes CCV, Simamoto-Júnior PC, Magalhães D. Bisphosphonate treatment and dental implants: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2016;21(5): 644-651
13. Yoneda T, Hagino H, Sugimoto T, Ohta H, Takahashi S et al. Antiresorptive agent-related osteonecrosis of the jaw: Position Paper 2017 of the Japanese Allied Committee on Osteonecrosis of the Jaw. *J Bone Miner Metab.* 2017;35(1): 6-19.
14. Liu J, Huang W, Zhou R, Jia S, Tang W et al. Bisphosphonates in the Treatment of Patients With Metastatic Breast, Lung, and Prostate Cancer: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore).* 2015;94(46): 1-5.
15. O'carrigan B, Wong MH, Wilson ML, Stockler MR, Pavlakis N, Goodwin A. Bisphosphonates and other bone agents for breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;-(10): 1-213.
16. Mhaskar R, Kumar A, Miladinovic B, Djulbegovic B. Bisphosphonates in multiple myeloma: an updated network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;-(12): 1-115.
17. Ruggiero SL. Diagnosis and Staging of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2015;27(4): 479-487.
18. Corsi A, Ungari C, Riminucci M, Agrillo A. Bisphosphonate-Related Osteonecrosis and Metastasis Within the Same Site of the Jaw. *J Oral Maxillofac Surg.* 2017;75(8): 1679-1684.
19. Hansen T, Kunkel M, Weber A, Kirkpatrick CJ. Osteonecrosis of the jaws in patients treated with bisphosphonates – histomorphologic analysis in comparison with infected osteoradionecrosis. *Kirkpatrick .* 2006;35(3): 155-160.
20. Marx RE, Tursun R. Suppurative osteomyelitis, bisphosphonate induced osteonecrosis, osteoradionecrosis: a blinded histopathologic comparison and its implications for the mechanism of each disease. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012;41(3): 283-289.
21. Mitsimponas KT, Moebius P, Amann K, Stockmann P, Schlegel K.A et al. Osteo-radio-necrosis (ORN) and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ): the histopathological differences under the clinical similarities. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(2): 496-508.

22. Qaisi M, Montague L. Bone Margin Analysis for Osteonecrosis and Osteomyelitis of the Jaws. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2017;29(3): 301-313.
23. Antoni CC, Matsumoto MA, Silva AAD, Curi MM, Santiago Júnior JFS et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw, osteoradionecrosis, and osteomyelitis: A comparative histopathological study. *Braz Oral Res.* 2018;32(E23): 1-7.
24. Martelli SJR, Damian MF, Gomes APN, Schinestsck AR, Silva AER, Vasconcelos ACU. Comparison of effects of zoledronic acid and clodronate on the bone structure: Imaginological and histomorphometrical study in vivo. *J Oral Pathol Med.* 2017;46(8): 632-636.
25. Nagata MJH, Messoria MR, Antoniali C, Fucini SE, Campos N et al. Long-term therapy with intravenous zoledronate increases the number of nonattached osteoclasts. *J Craniomaxillofac Surg.* 2017;45(11): 1860-1867.
26. Cho YA, Yoon HJ, Lee JI, Hong SP, Hong SD. Histopathological features of bisphosphonate-associated osteonecrosis: findings in patients treated with partial mandibulectomies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012;114(6): 785-791.
27. Franco-Pretto E, Pacheco M, Moreno A, Messa O, Gnecco J. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: clinical, imaging, and histopathology findings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2014;118(4): 408-417.
28. Jobke B, Milovanovic P, Amling M, Busse B. Bisphosphonate-osteoclasts: changes in osteoclast morphology and function induced by antiresorptive nitrogen-containing bisphosphonate treatment in osteoporosis patients. *Bone.* 2014;59(1): 37-43.
29. Biasotto M, Chiandussi S, Zacchingna S, Moimas S, Dore F et al. A novel animal model to study non-spontaneous bisphosphonates osteonecrosis of jaw. *J Oral Pathol Med.* 2010;39(5): 390-396.
30. Conte Neto N, Spolidorio LC, Andrade CR, Bastos A, Guimarães M, Marcantonio Júnior E. Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rodents. *Int J Exp Pathol.* 2013;94(1): 65-73.
31. Barba-Recreo P, Vera JLCP, Arranz MG, Yébenes L, Burgueño M. Zoledronic acid e Related osteonecrosis of the jaws Experimental model with dental extractions in rats. *J Craniomaxillofac Surg.* 2014;42(6): 744-750.

32. Conte Neto N, Spolidorio LC, Andrade CR, Esteves JC, Marcantonio Júnior E. Experimental osteonecrosis: development of a model in rodents administered alendronate. *Braz Oral Res.* 2016;30(1): 1-10.
33. Gutiérrez XV, Clavel JFG, Cepeda LAG. Dental extraction following zoledronate, induces osteonecrosis in rat's jaw. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2017;22(2): 177-184.
34. Sharma D, Hamlet S, Petcu E, Ivanovski S. Animal models for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws--an appraisal. *Oral Dis.* 2013;19(8): 747-754.
35. Senel FC, Duman MK, Muci E, Cankaya M, Pampu AA et al. Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109(3): 385-391.
36. Ponte FS, Catalfamo L, Micali G, Runci M, Cutroneo G et al. Effect of bisphosphonates on the mandibular bone and gingival epithelium of rats without tooth extraction. *Exp Ther Med.* 2016;11(5): 1678-1684.
37. Erben RG, Glösmann M. Histomorphometry in Rodents. In: Helfrich, M.H, Ralston, S.H (2ed.) *Bone Research Protocols.* United Kingdom: Human Press; 2012. p. 279.
38. Vilarinho JLP, Ferrare N, Moreira AMR, Moura HF, Acevedo AC, Chaves SB, Melo NS, Leite AF, Macedo SB, Souza MP, Guimarães ATB, Figueiredo PTS. Early bony changes associated with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rats: A longitudinal in vivo study. *Arch Oral Biol.* 2017;82(1): 79-85.
39. Coleman R. The long-term contribution of dyes and stains to histology and histopathology. *Acta Histochem.* 2006;108(2): 81-83.
40. Chan JK. The Wonderful Colors of the Hematoxylin–Eosin Stain in Diagnostic Surgical Pathology. *Int J Surg Pathol.* 2014;22(1): 12-32.
41. Marino KL, Zakhary I, Abdelsayed R.A, Carter JA, O'Neill JC et al. Development of a Rat Model of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw (BRONJ). *J Oral Implantol.* 2012;38(Spec): 511-518.
42. Khan AA, Morrison A, Hanley DA, Felsenberg D, Mccauley LK 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..

43. Zandi M, Dehghan A, Mofrad AM, Amini P, Vahdatinia F. Short-term perioperative teriparatide therapy for the prevention of medication-related osteonecrosis of the jaw: A randomized, controlled preclinical study in rats. *J Craniomaxillofac Surg.* 2017;45(2): 275-280.
44. Egan KP, Brennan TA, Pignolo RJ. Bone histomorphometry using free and commonly available software. *Histopathology.* 2012;61(6): 1168-1173.
45. Ross MH, Pawlina W. *Histologia Texto e Atlas.* (5th ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
46. Yam LT, Janckila AJ. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP): a personal perspective. *J Bone Miner Res.* 2003;18(10): 1894-1896.
47. Kuroshima S, Go VA, Yamashita J. Increased Numbers of Nonattached Osteoclasts After Long-Term Zoledronic Acid Therapy in Mice. *Endocrinology.* 2012;153(1): 17-28.
48. Gong X, Yu W, Zhao H, Su J, Sheng Q. Skeletal Site-specific Effects of Zoledronate on in vivo Bone Remodeling and in vitro BMSCs Osteogenic Activity. *Sci Rep.* 2017;7(36129): 1-13.
49. Sonis ST, Watkins BA, Lyng GD, Lerman MA, Anderson KC. Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. *Oral Oncol.* 2009;45(2): 164-172.
50. Curra C, Cardoso CL, Ferreira OJ, Curi MM, Matsumoto MA et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw Introduction of a new modified experimental model. *Acta Cir Bras.* 2016;31(5): 308-3013.
51. Vermeer J, Renders G, Duin MAV, Jansen I, Bakker LF et al. Bone-site-specific responses to zoledronic acid. *Oral Dis.* 2017;23(1): 126-133.
52. Kobayashi Y, Hiraga T, Ueda A, Wang L, Nakano MM et al. Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice. *J Bone Miner Metab.* 2010;28(2): 165-175.
53. Otto S, Pautke C, Jurado OM, Nehrbass D, Stoddart MJ et al. Further development of the MRONJ minipig large animal model. *J Craniomaxillofac Surg.* 2017;45(9): 1503-1514.

54. Eriksen EF, Pérez AD, Boonen S. Update on long-term treatment with bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis: a systematic review. *Bone*. 2014;58(1): 126-135.
55. Gudino LC, Tan AJ, Montes JDP, Ralston SH. Bisphosphonates for Paget's disease of bone in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;1(12): 1-130.
56. Dwan K, Phillipi CA, Steiner RD, Basel D. Bisphosphonate therapy for osteogenesis imperfecta. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;23(7): 1-74.
57. Coxon FP, Thompson K, Roelofs AJ, Ebetino FH, Rogers MJ. Visualizing mineral binding and uptake of bisphosphonate by osteoclasts and non-resorbing cells. *Bone*. 2008;42(5): 848-860.
58. Fleisch H, Russell RG, Straumann F. Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature*. 1966;212(5065): 901-903.
59. Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone*. 2011;49(1): 2-19.
60. Orriss IR, Arnett TR, Russell RG. Pyrophosphate: a key inhibitor of mineralisation. *Curr Opin Pharmacol*. 2016;28(1): 57-68.
61. Fleisch H, Neuman WF. Mechanisms of calcification: role of collagen, polyphosphates, and phosphatase. *Am J Physiol* 1961;200:1296-300. *Am J Physiol*. 1961;200(1): 1296-300.
62. Fleisch H, Bisaz S. Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. *Am J Physiol*. 1962;203(1): 671-675.
63. Katchburian E, Arana V. *Histologia e Embriologia Oral*. (2nd ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.
64. Russell RG, Mühlbauer RC, Bisaz S, Williams DA, Fleisch H. The influence of pyrophosphate, condensed phosphates, phosphonates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxyapatite in vitro and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomised rats. *Calcif Tissue Res* . 1970;6(3): 183-196.
65. Ebetino FH, Hogan AM, Sun S, Tsoumpra MK, Duan X et al. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. *Bone*. 2011;49(1): 20-33.

66. Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S et al. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone*. 2006;38(5): 617-627.
67. Lawson MA, Xia Z, Barnett BL, Triffitt JT, Phipps RJ et al. Differences between bisphosphonates in binding affinities for hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010;92(1): 149-155.
68. Lehenkari PP, Kellinsalmi M, Näpänkangas JP, Ylitalo KV, Mönkkönen J et al. Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. *Mol Pharmacol*. 2002;61(5): 1255-1262.
69. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res*. 1998;13(4): 581-589.
70. Beek EV, Pieterman E, Cohen L, Löwik C, Papapoulos S. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit isopentenyl pyrophosphate isomerase/farnesyl pyrophosphate synthase activity with relative potencies corresponding to their antiresorptive potencies in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;255(2): 491-494.
71. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*. 1992;70(3): 401-410.
72. Zerial M, Stenmark H. Rab GTPases in vesicular transport. *Curr Opin Cell Biol*. 1993;5(4): 613-620.
73. Luckman SP, Coxon FP, Ebetino FH, Russell RG, Rogers MJ. Heterocycle-containing bisphosphonates cause apoptosis and inhibit bone resorption by preventing protein prenylation: evidence from structure-activity relationships in J774 macrophages. *J Bone Miner Res*. 1998;13(11): 668-678.
74. Reiner B, Tresckow EV. Pharmacological Aspects of Antiresorptive Drugs: Bisphosphonates and Denosumab. In: Otto, S (ed.) *Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws*. Germany: Springer; 2015. p. 1-15.

75. Palmieri C, Fullarton JR, Brown J. Comparative efficacy of bisphosphonates in metastatic breast and prostate cancer and multiple myeloma: a mixed-treatment meta-analysis. *Clin Cancer Res.* 2013;19(24): 6863-6872.
76. Coleman RE, McCloskey EV. Bisphosphonates in oncology. *Bone.* 2011;49(1): 71-76.
77. Allen CS, Yeung JH, Vandermeer B, Homik J. Bisphosphonates for steroid-induced osteoporosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;10(1): 1-109.
78. Sales JP, Rodríguez CG, Torromé SL, Brunelli C, Pigni A, Caraceni A. Evidence on the analgesic role of bisphosphonates and denosumab in the treatment of pain due to bone metastases: A systematic review within the European Association for Palliative Care guidelines project. *Palliat Med.* 2017;31(1): 5-25.
79. Marginean O, Tamasanu RC, Mang N, Mozos I, Brad GF. Therapy with pamidronate in children with osteogenesis imperfecta. *Drug Des Devel Ther.* 2017;11(1): 2507-2515.
80. Lee SY, Jung SH, Lee SU, Ha YC, Lim JY. Can Bisphosphonates Prevent Recurrent Fragility Fractures? A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Am Med Dir Assoc.* 2018;5(19): 384-390.
81. Galis B, Zajko J, Hirjak D, Vanko L, Kupcova I et al. Is the prevalence of the medication-related osteonecrosis of the jaws underestimated, evaluation in oncological and non-oncological disease. *Bratisl Lek Listy.* 2017;12(118): 724-731.
82. Franco JWV, Castaneda B, Rédiní F, Gómez DF, Heymann D, Lézot F. Paradoxical side effects of bisphosphonates on the skeleton: What do we know and what can we do? *J Cell Physiol.* 2018;233(8): 5696-5715.
83. Malan J, Ettinger K, Naumann E, Beirne OR. The relationship of denosumab pharmacology and osteonecrosis of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012;114(6): 671-676.
84. Taylor KH, Middlefell LS, Mizen KD. Osteonecrosis of the jaws induced by anti-RANK ligand therapy. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2010;48(3): 221-223.
85. Hamadeh IS, Ngwa BA, Gong Y. Drug induced osteonecrosis of the jaw. *Cancer Treat Rev.* 2015;41(5): 455-464.
86. Mawardi H, Enzinger P, Mgcleary N, Manon R, Villa A et al. Osteonecrosis of the jaw associated with ziv-aflibercept. *J Gastrointest Oncol.* 2016;7(6): 81-87.

87. Fedele S, Porter SR, D'aiuto F, Aljohani S, Vescovi P et al. Nonexposed Variant of Bisphosphonate-associated Osteonecrosis of the Jaw: A Case Series. *Am J Med.* 2010;123(11): 1060-1064.
88. Lazarovici TS, Yoffe T. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws. In: Otto, S.V (ed.) *Epidemiology of Medication- Related Osteonecrosis of the Jaw.* Germany: Springer; 2015. p. 55-62
89. MCGowan K, MCGowan T, Ivanovski S. Risk factors for medication-related osteonecrosis of the jaws: A systematic review. *Oral Dis.*2018;24(4): 527-536.
90. Kwon T.G. Risk Factors for Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw. In: Otto SV (ed.) *Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws* In: Otto, SV (ed) Germany: Springer; 2015. p. 27-42.
91. Manfredi M, Mergoni G, Goldoni M, Salvagni S, Merigo E et al. A 5-year retrospective longitudinal study on the incidence and the risk factors of osteonecrosis of the jaws in patients treated with zoledronic acid for bone metastases from solid tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.*2017;22(3): 342-348.
92. Shibahara T, Morikawa T, Yago K, Kishimoto H, Imai Y, Kurita K. National Survey on Bisphosphonate- Related Osteonecrosis of the Jaws in Japan. *J Oral Maxillofac Surg.* 2018;2391(18): 1-8.
93. Aljohani S, Fliefel R, Ihbe J, Kühnisch J, Ehrenfeld M, Otto S. What is the effect of anti-resorptive drugs (ARDs) on the development of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) in osteoporosis patients: A systematic review. *J Craniomaxillofac Surg.* 2017;45(9): 1493-1502.
94. Yarom N, Lazarovici TS, Whitefield S, Wasserzug O, Yahalom R. Rapid onset of osteonecrosis of the jaw in patients switching from bisphosphonates to denosumab. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018;125(1): 27-30.
95. Higuchi T, Soga Y, Muro M, Kajozono Y, Kitamura Y et al. Replacing zoledronic acid with denosumab is a risk factor for developing osteonecrosis of the jaw. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018;125(6): 547-551.
96. Otto S, Aguirre JI. et al. Pathogenesis of Medication- Related Osteonecrosis of the Jaw. In: Otto, S (ed.) *Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws.* Germany: Springer; 2015. p. 139-148.
97. Fliefel R, Otto S. Pathogenesis of antiresorptive drug-related osteonecrosis of the jaw. In: Fleisher, K.E, Kontio, R, Otto, S (eds.) *Antiresorptive Drug-related*

Osteonecrosis of the Jaw (ARONJ)—a Guide to Research. Switzerland: AOCMF; 2016. p. 45-52.

98. Huja SS, Fernandez SA, Hill KJ, Li Y. Remodeling dynamics in the alveolar process in skeletally mature dogs. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2006;288(12): 1243-1249.

99. Suanzes JAC, Ugalde VR, Seiquer AC, Villar EL, Lopez JH et al. Preventive dental management of osteonecrosis of the jaws related to zoledronic acid treatment. *Oral Dis.* 2018;2018(0): 1-8.

100. Cariolatto FA, Carelli J, Moreira TC, Piebrobon R, Rodrigues C, Ferreira APB. Recommendations for the Prevention of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw: A Systematic Review. *J Evid Based Dent Pract.* 2018;18(2): 142-152.

101. Otto S, Pautke C, Opelz C, Westphal I, Drosse I et al. Osteonecrosis of the jaw: effect of bisphosphonate type, local concentration, and acidic milieu on the pathomechanism. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(11): 2837-2845.

102. Otto S, Hafner S, Mast G, Tisher T, Volkmer E et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: is pH the missing part in the pathogenesis puzzle? *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;38(5): 1158-1161.

103. Badel T, Pavicin IS, Carek AJ, Grget KR, Grbesa D. Pathophysiology of osteonecrosis of the jaw in patients treated with bisphosphonate. *Coll Antropol.* 2013;37(2): 645-651.

104. Ikebe T. Pathophysiology of BRONJ: Drug-related osteoclastic disease of the jaw. *Oral Science International.* 2013;10(1): 1-8.

105. Basso FG, Turrione APS, Hebling J, Costa CAS. Zoledronic Acid Inhibits Human Osteoblast Activities. *Gerontology.* 2013;59(6): 534-541.

106. Moreno FJM, Torrecillas JR, Bertos ELB, Ruiz C, Martínez OG. High doses of bisphosphonates reduce osteoblast-like cell proliferation by arresting the cell cycle and inducing apoptosis. *J Craniomaxillofac Surg.* 2015;43(3): 396-401.

107. Zafar S, Coates DE, Cullinan MP, Drummond BK, Milne T, Seymour GJ. Effects of zoledronic acid and geranylgeraniol on the cellular behaviour and gene expression of primary human alveolar osteoblasts. *Clin Oral Investig.* 2016;20(8): 2023-2035.

108. Kauffmann P, Hahn W, Sievers N, Troeltzsch M, Hohloch K et al. Osteoblast-like cells with different embryologic origins behave differently in increasing zoledronic acid concentrations: a pilot study in pigs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2017;123(1): 20-28.
109. Roelofs AJ, Coxon FP, Ebetino FH, Lundy MW, Henneman ZJ et al. Fluorescent Risedronate Analogues Reveal Bisphosphonate Uptake by Bone Marrow Monocytes and Localization Around Osteocytes In Vivo. *J Bone Miner Res.* 2010;25(3): 606-616.
110. Bala Y, Depalle B, Farlay D, Douillard T, Meille S et al. Bone micromechanical properties are compromised during long-term alendronate therapy independently of mineralization. *J Bone Miner Res.* 2012;27(4): 825-834.
111. Kim JW, Landayan ME, Lee JY, Tatad JC, Kim SJ et al. Role of microcracks in the pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Clin Oral Investig.* 2016;20(8): 2251-2258.
112. Li GW, Xu Z, Chang SX, Zhou L, Wang XY et al. Influence of Early Zoledronic Acid Administration on Bone Marrow Fat in Ovariectomized Rats. *Endocrinology.* 2014;155(12): 4731-4738.
113. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9(5): 641-650.
114. Patel JJ, Butters OR, Arnett TR. PPAR agonists stimulate adipogenesis at the expense of osteoblast differentiation while inhibiting osteoclast formation and activity. *Cell Biochem Funct.* 2014;32(4): 368-377.
115. Chen Q, Shou P, Zheng C, Jiang M, Cao G et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts?. *Cell Death Differ.* 2016;23(7): 1128-1139.
116. Yang Y, Luo X, Yan F, Jiang Z, Li Y et al. Effect of zoledronic acid on vertebral marrow adiposity in postmenopausal osteoporosis assessed by MR spectroscopy. *Skeletal Radiol.* 2015;44(10): 1499-1505.
117. Aguirre JI, Akhter MP, Kimmel DB, Pingel JE, Williams, A et al. Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in rice rats (*Oryzomys palustris*) with periodontitis. *J Bone Miner Res.* 2012;27(10): 2130-2143.
118. Filleul O, Crompton E, Saussez S. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a review of 2,400 patient cases. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010;136(8): 1117-1124.

119. Hinson AM, Smith CW, Siegel ER, Stack Júnior BC. Is Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw an Infection? A Histological and Microbiological Ten-Year Summary. *Int J Dent*. 2014;452737(1): 1-7.
120. Panya S, Fliefel R, Probst F, Tröltzsch M, Ehrenfeld M et al. Role of microbiological culture and polymerase chain reaction (PCR) of actinomyces in medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). *J Craniomaxillofac Surg*. 2017;45(3): 357-363.
121. Hallmer F, Bjørnland T, Andersson G, Becktor JP, Kristoffersen AK et al. Bacterial diversity in medication-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2017;123(4): 436-444.
122. Landesberg R, Woo V, Cremers S, Cozin M, Marolt D et al. Potential pathophysiological mechanisms in osteonecrosis of the jaw. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1218(1): 62-79.
123. Vincenzi B, Santini D, Dicuonzo G, Battistoni F, Gavasci M et al. Zoledronic acid-related angiogenesis modifications and survival in advanced breast cancer patients. *J Interferon Cytokine Res*. 2005;25(3): 144-151.
124. Fantasia JE. The Role of Antiangiogenic Therapy in the Development of Osteonecrosis of the Jaw. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2015;27(4): 547-553.
125. Lang M, Zhou Z, Shi L, Niu J, Xu S et al. ScienceDirectInfluence of zoledronic acid on proliferation, migration, and apoptosis of vascular endothelial cells. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2016;54(8): 889-893.
126. Darbois JDK, Libouban H, Mabillean G, Grizon FP, Chappard D. Bone mineralization and vascularization in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: an experimental study in the rat. *Clin Oral Investig* . 2018;16(1): 1-10.
127. Moon DH, Moon SH, Wang K, Weissler MC, Hackman TH et al. Incidence of, and risk factors for, mandibular osteoradionecrosis in patients with oral cavity and oropharynx cancers. *Oral Oncol*. 2017;72(1): 72-98.
128. Cann TV, Loyson T, Verbiest A, Clement PM, Bechter O et al. Incidence of medication-related osteonecrosis of the jaw in patients treated with both bone resorption inhibitors and vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Support Care Cancer*. 2018;26(3): 869-878.

129. Scheper MA, Badros A, Chaisuparat R, Cullen KJ, Meiller TF. Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Br J Haematol.* 2009;144(5): 667-676.
130. Ravosa MJ, Ning J, Liu Y, Stack MS. Bisphosphonate effects on the behaviour of oral epithelial cells and oral fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 2011;56(5): 491-498.
131. Reid IR, Bolland MJ, Grey AB. Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? *Bone.* 2007;41(3): 318-320.
132. Schiodt M, Herlofson B.B. Clinical features of antiresorptive drug-related osteonecrosis of the jaw. In: Fleisher KE, Kontio R, Otto S (eds.) *Antiresorptive Drug-related Osteonecrosis of the Jaw (ARONJ)—a Guide to Research.* Switzerland: AOCMF; 2016. p. 9-22.
133. Allen MR, Burr DB. Mandible Matrix Necrosis in Beagle Dogs After 3 Years of Daily Oral Bisphosphonate Treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66(5): 987-994.
134. Gotcher JE, Jee WS. The progress of the periodontal syndrome in the rice rat. *J Periodontal Res.* 1981;16(3): 275-291.
135. Leite AF, Ogata FS, Melo NS, Figueiredo PT. Imaging Findings of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws: A Critical Review of the Quantitative Studies. *Int J Dent.* 2014;2014(784348): 1-11.
136. Córdova LA, Guilbaud F, Amiaudi J, Bettaglia S, Charrier C et al. Severe compromise of preosteoblasts in a surgical mouse model of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. *J Craniomaxillofac Surg.* 2016;44(9): 1387-1394.
137. Matsumoto MA, Furquim EM, Gonçalves A, Santiago-Junior JF, Saraiva, PP et al. Aged rats under zoledronic acid therapy and oral surgery. *J Craniomaxillofac Surg.* 2017;45(5): 781-787.
138. Aghaloo TL, Kang B, Sung EC, Shoff M, Ronconi M et al. Periodontal Disease and Bisphosphonates Induce Osteonecrosis of the Jaws in the Rat. *J Bone Miner Res.* 2011;26(8): 1871-1882.
139. Soundia A, Hadaya D, Esfandi N, Molon RS, Bezouglaia O et al. Osteonecrosis of the jaws (ONJ) in mice after extraction of teeth with periradicular disease. *Bone.* 2016;90(1): 133-141.
140. Rao NJ, Wang JY, Yu RQ, Leung YY, Zheng LW. Role of Periapical Diseases in Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws. *Biomed Res Int.* 2017;2017(1):1-8.

141. França TRT, Ramos-Perez FMM, Pontual AA, Castro JFL, Bonan PRF, Perez DLC. Effects of Zoledronic Acid in Experimental Periapical Lesions in Rats: An Imaging and Histological Analysis. *Braz Dent J.* 2017;28(5): 566-572.
142. Hokugo A, Christensen R, Chung EM, Sung EC, Felsenfeld AL et al. Increased Prevalence of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw with Vitamin D Deficiency in Rats. *J Bone Miner Res.* 2010;25(6): 1337-1349.
143. Berti-Couto SA, Vasconcelos ACU, Iglesias JE, Figueiredo MAZ, Salum FG, Cherubini K. Diabetes mellitus and corticotherapy as risk factors for alendronate-related osteonecrosis of the jaws: A study in Wistar rats. *Head Neck.* 2014;36(1): 84-93
144. Burr DB, Allen MR. Mandibular necrosis in beagle dogs treated with bisphosphonates. *Orthod Craniofac Res.* 2009;12(3): 221-228.
145. Mergoni G, Vescovi P, Sala R, Merigo E, Passerini P et al. The effect of laser therapy on the expression of osteocalcin and osteopontin after tooth extraction in rats treated with zoledronate and dexamethasone. *Support Care Cancer.* 2016;24(2): 807-813.
146. Koneski F, Monevska DP, Gjorgoski I, Krajoska J, Popovska M et al. In vivo effects of geranylgeraniol on the development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Craniomaxillofac Surg.* 2017;46(2): 230-236.
147. Yalcin-Ulker GM, Cumbul A, Capar GD, Uslu U, Sencift K. Preventive Effect of Phosphodiesterase Inhibitor Pentoxifylline against Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: An Animal Study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2017;75(11): 2354-2368.
148. Yanik S, Aras MH, Erkiliç S, Bozdog Z, Demir T, Çetiner S. Histopathological features of bisphosphonates related osteonecrosis of the jaw in rats with and without vitamin d supplementation. *Arch Oral Biol.* 2016;65(1): 59-65.
149. Oh JS, Kim SG. Collagen sponge and rhBMP-2 improve socket healing in rats treated with zoledronic acid. *Braz Oral Res.* 2017;31(E99): 1-8.
150. Ersan N, Ruijven LJ, Bronckers AL, Olgaç V, Ilgüy D, Everts V. Teriparatide and the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a rat model. *Dentomaxillofac Radiol.* 2014;43(1): 1-8.
151. Zandi M, Dehghan A, Janbaz P, Malekzadeh H, Amini P. The starting point for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: Alveolar bone or oral mucosa? A

- randomized, controlled experimental study. *J Craniomaxillofac Surg.* 2017;45(1): 157-161.
152. Zandi M, Dehghan A, Zandipoor N, Amini P, Doulati S. Effect of different doses and durations of teriparatide therapy on resolution of medication-related osteonecrosis of the jaw: A randomized, controlled preclinical study in rats. *J Craniomaxillofac Surg.* 2018;46(3): 466-472.
153. Mada EY, Santos AC, Fonseca AC, Biguetti CC, Neves FT et al. Effects of green tea and bisphosphonate association on dental socket repair of rats. *Arch Oral Biol.* 2017;75(1): 1-7.
154. Vilarinho J. Modelo animal de osteonecrose associada ao uso de bisfosfonatos: avaliação por microtomografia em três tempos: inicial, intermediária e final. [Mestrado]. Universidade de Brasília; 2016.
155. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Diretriz da Prática de Eutanásia do Concea. Brasília:2015.
156. Warshawsky H, Moore G. A technique for the fixation and decalcification of rat incisors for electron microscopy. *J Histochem Cytochem.* 1967;15(9): 542-549.
157. González-García R, Monje F. Is micro-computed tomography reliable to determine the microstructure of the maxillary alveolar bone? *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(7): 730-737.
158. Aghaloo TL, Cheong S, Besouglaia O, Kostenuik P, Atti E et al. RANKL Inhibitors Induce Osteonecrosis of the Jaw in Mice With Periapical Disease. *J Bone Miner Res.* 2014;29(4): 843-854.
159. Williams DW, Lee C, Kim T, Yagita H, Wu H et al. Impaired Bone Resorption and Woven Bone Formation Are Associated with Development of Osteonecrosis of the Jaw-Like Lesions by Bisphosphonate and Antireceptor Activator of NF- κ B Ligand Antibody in Mice. *Am J Pathol.* 2014;184(11): 3084-3093.
160. Yamashita J, Koi K, Yang DY, McCauley LK. Effect of Zoledronate on Oral Wound Healing in Rats. *Clin Cancer Res.* 2011;17(6): 1405-1414
161. Rana RS, Wu JS, Eisenberg RL. Periosteal reaction. *AJR Am J Roentgenol.* 2009;193(4): 259-272.

162. Baba A, Goto TK, Oriji H, Takagiwa M, Hiraga C 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.
163. Hutchinson M, O'ryan F, Chavez V, Lathon PV, Sanchez G 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): 2232-2240.
164. Duque G, Li W, Adams M, Xu S, Phipps R. Effects of risedronate on bone marrow adipocytes in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2011;22(5): 1547-1553.
165. Li GW, Tang G, Liu Y, Tang RB, Peng, YF, Li W. MR spectroscopy and micro-CT in evaluation of osteoporosis model in rabbits: comparison with histopathology. *Eur Radiol.* 2012;22(4): 923-929.
166. Yang H, Pan H, Yu F, Chen K, Shang G, Xu Y. A novel model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rats. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(5): 5161-5167.
167. Weinstein RS, Roberson PK, Manolagas SC. Giant Osteoclast Formation and Long-Term Oral Bisphosphonate Therapy. *N Engl J Med.* 2009;360(1): 53-62.
168. Vidal B, Pinto A, Galvão MJ, Santos AR, Rodrigues A et al. Bone histomorphometry revisited. *Acta Reumatol Port.* 2012;37(4): 294-300.
169. Dal-prá KJ, Lemos CA, Okamoto R, Soubhia AM, Pellizzer EP. Efficacy of the C-terminal telopeptide test in predicting the development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2017;46(2): 151-156.
170. Bagan L, Jiménez Y, Leopoldo M, Rubert A, Bagan J. Serum levels of RANKL and OPG, and the RANKL/OPG ratio in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: Are they useful biomarkers for the advanced stages of osteonecrosis?. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2017;22(5): 542-547.

ANEXO – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA (CEUA)



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 PÓSTRONS.**”, 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.