

Helora Freitas Moura

Modelo animal de osteonecrose associada ao uso de
zoledronato: um estudo longitudinal *in vivo*

Brasília
2017

Helora Freitas Moura

Modelo animal de osteonecrose associada ao uso de
zoledronato: um estudo longitudinal *in vivo*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Departamento de Odontologia da Faculdade de
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília,
como requisito parcial para a conclusão do curso
de Graduação em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. André Ferreira Leite

Co-orientadora: Prof. Dra. Nilce Santos de Melo

Brasília
2017

Dedico esse trabalho ao meus pais, Sarita e Luís, que dedicaram parte de suas vidas à minha educação e são o maior exemplo de esforço, coragem e perseverança que eu pude receber.

Ao meu noivo Pedro, pelo carinho, paciência e companheirismo durante o meu curso de graduação. Ao meu irmão Caio que aceitou a minha ausência para poder me dedicar aos estudos.

A todos que participaram e apoiaram a realização desse estudo, em especial meus professores orientadores e minhas amigas Andréia e Raiza, profissionais de excelência que me ensinaram a importância do trabalho em equipe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida, por me conceder fé, força e coragem para enfrentar todos os desafios durante a minha jornada acadêmica.

À minha família, sempre presente ao me apoiar em cada etapa dessa conquista e em especial, à minha amada mãe e melhor amiga, Sarita, que me ensinou o valor do estudo desde pequena. Obrigada pela dedicação incondicional a mim e ao meu irmão nunca desistindo de nos incentivar a lutar pelo nosso futuro, transmitindo os valores que são a base do meu caráter e que me proporcionam ser uma pessoa de bem. Espero retribuir e corresponder todo esse carinho e amor que possibilitaram a chegada desse momento.

Ao meu querido pai, Luís, que não mediu esforços para prover as melhores fontes de aprendizado oportunizando a busca de novos conhecimentos com uma educação de qualidade. Obrigada pela amizade e pelo carinho ao me incentivar a seguir o caminho certo estando pronto a ajudar nos momentos difíceis.

Ao meu estimado irmão, Caio, que fora meu primeiro grande amigo. Agradeço pelo companheirismo durante a nossa infância e por ter cuidado dos nossos pais na minha ausência. Desejo que você tenha oportunidades ainda maiores que as minhas, alcance sucesso nas suas escolhas e seja feliz.

Agradeço também aos meus avós, tios e primos que carinhosamente souberam contribuir para a minha motivação nos estudos.

Ao meu amado noivo, Pedro Henrique, que ilustra a perseverança, a coragem, a paciência e o amor ao próximo. Sou grata pelo apoio constante dedicado a mim, mesmo com os entraves da distância, pelo incentivo a vencer as dificuldades e por estar ao meu lado para enfrentá-las, tornando-me parte de sua vida e de sua família.

Agradeço a oportunidade conquistada com muito esforço de estudar na Universidade de Brasília, a dedicação de todo o corpo docente que compõe o curso de graduação de Odontologia por aprimorar os conhecimentos dos alunos e o encaminhar do próprio curso. Em especial, aos meus professores orientadores que viabilizaram a realização desse trabalho e aos professores de outras instituições que também contribuíram para o meu aprendizado.

Ao meu orientador, Professor André Leite, um exemplo de respeito e dedicação à área acadêmica que com sua notável capacidade de liderança, forneceu o suporte necessário para o encaminhamento desse trabalho.

À minha co-orientadora, Professora Nilce Melo, que instigou a realização de novos questionamentos, permitindo descobertas de novas respostas para o desenvolvimento desse estudo.

Ao Professor Paulo Tadeu, um exemplo de profissional da saúde, que mostrou uma dedicação singular aos pacientes, me ensinando a realizar um trabalho humanizado.

Às Professoras Ana Carolina Acevedo e Eliete Guerra que possibilitaram a realização da pesquisa no laboratório, ressaltando a importância da pesquisa científica como chave do aprimoramento profissional.

À Professora Carla Ruffeil, que acompanhou a etapa final da minha graduação e transmitiu significativas recomendações para o meu sucesso profissional.

À Professora Ana Paula Ribeiro, que permitiu o meu primeiro contato com pesquisas laboratoriais na Universidade e motivou a minha dedicação aos conhecimentos científicos.

Aos Professores Paulo Coelho, Nick Tovar e Ronaldo Hirata, agradeço por possibilitarem um contato diferenciado com a pesquisa científica durante meu intercâmbio pelo Programa Ciências Sem Fronteiras, permitindo o acompanhamento e a participação em diversos projetos. Um agradecimento especial à

Professora Camila Sampaio pelo carinho e dedicação ao me orientar durante as pesquisas nesse período.

Às Professoras Soraya Leal e Simone Otero, que permitiram a realização da minha primeira apresentação de trabalhos em congressos fora de Brasília, fornecendo todo o apoio necessário.

À Professora Janine Araki, agradeço aos incentivos e orientações durante a participação no estágio da Odontoclínica de Aeronáutica de Brasília.

Às Mestrandas e grandes amigas, Andréia Moreira e Raiza Querrer, pelo companherismo, apoio e paciência ao longo do curso e pela amizade afetuosa que permanece.

Às Doutorandas Nathália Ferrare e Josy Vilarinho, profissionais que me acolheram cuidadosamente durante o estudo e permitiram o desenvolvimento desse trabalho a partir de seus projetos.

A todos os colegas de turma com os quais dividi os meus anseios, alegrias e conquistas ao longo do curso, em especial, à amiga Larissa Ribeiro pela parceria durante os atendimentos clínicos, meus carinhosos agradecimentos.

Agradeço a todos os meus amigos e as pessoas que Deus colocou em minha vida e que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação.

EPÍGRAFE

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis ”.

José de Alencar

RESUMO

FREITAS MOURA, Helora. Modelo animal de osteonecrose associada ao uso de zoledronato: um estudo longitudinal *in vivo*. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Objetivo: Apresentar um modelo animal de osteonecrose relacionada ao uso de zoledronato (MRONJ), com análise clínica e microtomográfica em três tempos distintos Design: 40 ratas foram randomicamente divididas em dois grupos, cada um com 20 ratas. O grupo experimental recebeu 66 µg/kg de ácido zoledrônico e o grupo controle recebeu soro fisiológico em volume semelhante, três vezes por semana, durante três semanas. Três semanas após o início da medicação, as ratas foram aleatoriamente selecionadas e submetidas à extração do primeiro molar inferior esquerdo. As análises ocorreram no início do experimento (T₀); após 3 semanas de medicação (T₁) e 6 semanas após a exodontia (T₂). Na análise clínica foi considerada a ocorrência de: cicatrização, exposição óssea, abscesso e fístula. Destruição cortical, reação periosteal e sequestro ósseo constituíram os critérios para análise qualitativa microtomográfica. Quantitativamente, foram calculadas a densidade mineral óssea, espessura trabecular. Os resultados foram tratados estatisticamente (ANOVA-fatorial). Resultados: Nenhum animal do grupo controle desenvolveu MRONJ. No grupo ZA, 76% dos animais apresentaram exposição óssea. De T₀ para T₁, Tb.Th e BV/TV apresentaram um aumento e em T₂ os valores mostraram-se mais aumentados no grupo ZA do que no grupo controle. BMD mostrou-se aumentado durante as três fases experimentais em ambos os grupos. Conclusão: Este modelo reproduz de forma aceitável o quadro clínico e imagiológico compatível com osteonecrose em humanos e

descortina importantes alterações ósseas surgidas precocemente, em decorrência da medicação. No entanto, a presença de restos radiculares pode ter influenciado nos resultados. Novos modelos animais, sistematizando o trauma local indutor da doença devem ser propostos.

ABSTRACT

FREITAS MOURA, Helora. Animal model of osteonecrosis of the jaw induced by zoledronate: a longitudinal *in vivo* study. 2017. Undergraduate Course Final Monograph (Undergraduate Course in Dentistry) – Department of Dentistry, School of Health Sciences, University of Brasília.

Objective: To promote a clinical and microtomographic analysis of an animal model of medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ) in three different phases. **Design:** Forty rats were randomly divided in 2 groups (control and experimental), each group containing 20 rats. Bone changes were evaluated by clinical examination, and microtomography was evaluated in three phases: before starting the experiment (T_0), after three weeks of zoledronate (T_1), and 6 weeks after dental extraction (T_2). It was also evaluated the healing, and the presence of bone exposure, abscess and fistulae. The analyzed microtomographic findings were the presence of cortical destruction, periosteal reaction, and bone sequestrum. In a three-dimensional region of interest (ROI), the calculated microtomographic parameters were bone mineral density, trabecular thickness and trabecular number. The differences were analyzed by ANOVA-factorial ($p < 0.05$). **Results:** None of the animals of the control group developed MRONJ. In the ZA group, 76 % presented bone exposure. From T_0 to T_1 , Tb.Th and BV/TV increased, and in T_2 , the mean values were higher in ZA group than in the control group. BMD increased throughout the different phases of both groups. **Conclusions:** The experiment was successful in inducing MRONJ, revealing early bone changes associated with zoledronate. The presence of residual roots may have interfered in the results. Thus, new animal models should systematize the local trauma's induction.

LISTA DE ABREVIATURAS E DE SIGLAS

BF(s)	Bifosfonato(s)
microCT	Microtomografia computadorizada
R1	Radical um da formula química geral do BF
R2	Radical dois da formula química geral do BF
BRONJ	Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (osteonecrose maxilomandibular associada ao uso de bifosfanato)
MRONJ	Medication-related osteonecrosis of the jaw (osteonecrose maxilomandibular associada ao uso de medicamento antirreabsortivos ou antiangiogênicos)
T ₀	Primeiro exame microtomográfico
T ₁	Segundo exame microtomográfico
T ₂	Terceiro exame microtomográfico
Tb.N	Número trabecular ou de trabéculas
Tb.Sp	Número trabecular
Tb.Th	Espessura trabecular óssea
BV/TV	Proporção de volume ósseo
FD	Dimensão fractal
BMD	Densidade mineral óssea
kV	Quilo-Volt – unidade de medida de tensão
µA	Micro-Ampère – unidade de corrente elétrica
bit	Capacidade de processamento
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
g	Gramma
h	Hora
%	Porcentagem
µg	Micrograma
µm	Micrometro
mm	Milímetro
3D	Tridimensional ou três dimensões

ROI	Região de interesse
VOI	Área de interesse determinada em 3D na imagem para cálculos definidos, a fim de se obter análise quantitativa das alterações ósseas
CO ₂	Dióxido de carbono
CT	Tomografia computadorizada
CBCT	Tomografia Computadorizada Cone Beam

SUMÁRIO

Artigo Científico	
Folha de Título	23
Resumo	25
Abstract	27
Introdução	29
Materiais e Métodos	33
Resultados	40
Discussão	45
Aspectos Ressaltados	54
Agradecimentos	54
Referências	55
Apêndice.....	63
Anexos.....	73

ARTIGO CIENTÍFICO

Este trabalho de Conclusão de Curso é baseado no artigo científico: VILARINHO, Josy; FERRARE, Nathalia; MOREIRA, Andréia; MOURA, Helora; ACEVEDO, Ana Carolina; MELO, Nilce; CHAVES, Sasha; LEITE, André; FIGUEIREDO, Paulo Tadeu; MACEDO, Sérgio; SOUZA, Melissa; GUIMARÃES, Ana Tereza. Early bony changes associated with bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw in rats: a longitudinal in vivo study.

Apresentado sob as normas de publicação do Revista Archives of Oral Biology

FOLHA DE TÍTULO

Modelo animal de osteonecrose associada ao uso de zoledronato: um estudo longitudinal *in vivo*

Animal model of osteonecrosis of the jaw induced by zoledronate: a longitudinal *in vivo* study

Helora Freitas Moural¹

André Ferreira Leite²

Nilce Santos de Melo³

¹ Aluna de Graduação em Odontologia da Universidade de Brasília.

² Professor Adjunto de Radiologia Oral da Universidade de Brasília (UnB).

³ Professora Adjunta da Universidade de Brasília.

Correspondência: Prof. Dr. André Ferreira Leite
Campus Universitário Darcy Ribeiro - UnB - Faculdade de Ciências da Saúde - Departamento de Odontologia - 70910-900 - Asa Norte - Brasília - DF
E-mail: andreleite@unb.br / Telefone: (61) 31071849

RESUMO

Modelo animal de osteonecrose associada ao uso de zoledronato: um estudo longitudinal *in vivo*

Objetivo: Apresentar um modelo animal de osteonecrose relacionada ao uso de zoledronato (MRONJ), com análise clínica e microtomográfica em três tempos distintos Design: 40 ratas foram randomicamente divididas em dois grupos, cada um com 20 ratas. O grupo experimental recebeu 66 µg/kg de ácido zoledrônico e o grupo controle recebeu soro fisiológico em volume semelhante, três vezes por semana, durante três semanas. Três semanas após o início da medicação, as ratas foram aleatoriamente selecionadas e submetidas à extração do primeiro molar inferior esquerdo. As análises ocorreram no início do experimento (T₀); após 3 semanas de medicação (T₁) e 6 semanas após a exodontia (T₂). Na análise clínica foi considerada a ocorrência de: cicatrização, exposição óssea, abscesso e fístula. Destruição cortical, reação periosteal e sequestro ósseo constituíram os critérios para análise qualitativa microtomográfica. Quantitativamente, foram calculadas a densidade mineral óssea, espessura trabecular. Os resultados foram tratados estatisticamente (ANOVA-fatorial). Resultados: Nenhum animal do grupo controle desenvolveu MRONJ. No grupo ZA, 76% dos animais apresentaram exposição óssea. De T₀ para T₁, Tb.Th e BV/TV apresentaram um aumento e em T₂ os valores mostraram-se mais aumentados no grupo ZA do que no grupo controle. BMD mostrou-se aumentado durante as três fases experimentais em ambos os grupos. Conclusão: Este modelo reproduz de forma aceitável o quadro clínico e imaginológico compatível com osteonecrose em humanos e descortina importantes alterações ósseas surgidas precocemente, em decorrência da medicação. No entanto, a presença de restos radiculares pode ter influenciado nos

resultados. Novos modelos animais, sistematizando o trauma local indutor da doença devem ser propostos.

Palavras-chaves: Osteonecrose dos Maxilares Relacionada a Medicação; Ácido Zoledrônico; Microtomografia Computadorizada; Modelo Animal.

ABSTRACT

Animal model of osteonecrosis of the jaw induced by zoledronate: a longitudinal *in vivo* study

Objective: To promote a clinical and microtomographic analysis of an animal model of medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ) in three different phases. **Design:** Forty rats were randomly divided in 2 groups (control and experimental), each group containing 20 rats. Bone changes were evaluated by clinical examination, and microtomography was evaluated in three phases: before starting the experiment (T_0), after three weeks of zoledronate (T_1), and 6 weeks after dental extraction (T_2). It was also evaluated the healing, and the presence of bone exposure, abscess and fistulae. The analyzed microtomographic findings were the presence of cortical destruction, periosteal reaction, and bone sequestrum. In a three-dimensional region of interest (ROI), the calculated microtomographic parameters were bone mineral density, trabecular thickness and trabecular number. The differences were analyzed by ANOVA-factorial ($p < 0.05$). **Results:** None of the animals of the control group developed MRONJ. In the ZA group, 76 % presented bone exposure. From T_0 to T_1 , Tb.Th and BV/TV increased, and in T_2 , the mean values were higher in ZA group than in the control group. BMD increased throughout the different phases of both groups. **Conclusions:** The experiment was successful in inducing MRONJ, revealing early bone changes associated with zoledronate. The presence of residual roots may have interfered in the results. Thus, new animal models should systematize the local trauma's induction.

KEYWORDS: Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws; Zoledronic Acid; Microcomputed Tomography; Animal Model.

1. Introdução

Os bifosfonatos (BFs) são medicamentos antireabsortivos que interferem nos mecanismos de remodelação óssea, resultando em um aumento da densidade mineral desse tecido (Ruggiero et al., 2015). Essas drogas ligam-se a hidroxiapatita do osso atuando na supressão da atividade osteoclástica, de modo a reduzir a perda óssea (Cremers & Papapoulos, 2011; Drake, Clarke & Khosla, 2008). Dessa forma, os BFs tornaram-se amplamente prescritos para o tratamento de desordens relacionadas ao metabolismo do cálcio no organismo.

A eficácia e a segurança de uso dos BFs são baseadas na singular seletividade de seus componentes químicos pelo tecido ósseo (Cremers & Papapoulos, 2011). Esses medicamentos são análogos estáveis do pirofosfato e os BFs nitrogenados apresentam um aumento da afinidade pelo tecido ósseo e da capacidade antirreabsortiva (Graham & Russell, 2011). Graças a sua composição química, esses medicamentos apresentam alta aplicabilidade clínica.

Doenças que envolvem reabsorção óssea como por exemplo: osteoporose, metástases ósseas, mieloma múltiplo, doença de Paget, osteogênese imperfeita, tumores sólidos e outras, tornaram-se alvo da ação dessas drogas (Cremers & Papapoulos, 2011; Drake, Clarke & Khosla, 2008). Desde 2003, um grande número de casos relatam que a terapia a base de bisfosfonatos pode resultar em áreas de osso exposto e necrótico, que são particularmente observadas nos maxilares (Marx, 2003; Ruggiero et al., 2014). Inicialmente, essa condição foi denominada osteonecrose por bisfosfonatos – BRONJ, porém, é atualmente descrita como osteonecrose dos maxilares relacionada à medicação – MRONJ (Ruggiero et al., 2014).

O diagnóstico da MRONJ é primeiramente baseado na avaliação clínica da doença. Essa pode ser diagnosticada por meio de três critérios: osso exposto ou necrótico que pode ser

sondado através de fístula intraoral e extraoral na região maxilofacial, não havendo cura em até oito semanas; tratamento atual ou anterior com agentes antireabsortivos ou antiangiogênicos e ausência de radioterapia na região de cabeça e pescoço (Ruggiero et al., 2014). As características da doença tornam o tratamento mais complexo e com um grau de dificuldade aumentado, apresentando um impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes acometidos. Desse modo, a detecção precoce do risco a osteonecrose na região maxilo-facial, antes da ocorrência de exposição óssea e a possibilidade de prever áreas susceptíveis tornam-se significativos para a condução terapêutica dos pacientes acometidos por essa condição (Taniguchi et al., 2016).

Alguns aspectos foram propostos para explicar a patofisiologia da doença como: remodelação óssea ou supressão da reabsorção óssea, inibição da angiogênese, presença de microtraumas constantes, supressão da imunidade inata e/ou adquirida, deficiência de vitamina D, toxicidade do tecido mole e inflamação ou infecção (Ruggiero et al., 2014). No entanto, os mecanismos exatos que envolvem o desenvolvimento da doença ainda não foram completamente elucidados.

A duração da terapia medicamentosa, o tipo de droga, o trauma local e a resposta óssea local (de cunho genético e sistêmico) são apontados como aspectos de risco relacionados aos principais fatores etiológicos da doença (Barasch et al., 2011; Saad et al., 2012; Rasmusson & Abtahi, 2014). Além disso, os bifosfonatos nitrogenados possuem maior potência terapêutica, oferecendo, porém, maiores riscos ao desenvolvimento da MRONJ. O ácido zoledrônico apresenta a maior potência dentre os bifosfonatos a base de nitrogênio e devido a essa característica é associado a um risco aumentado à doença (Cremers & Papapoulos, 2011).

A MRONJ caracteriza-se pelos sinais e sintomas de dor, mobilidade dental, edema na mucosa oral, ulcerações e

exposições ósseas (Rasmusson & Abtahi, 2014). As modificações estruturais, avaliadas radiograficamente, permeiam alterações da lâmina dura e das corticais ósseas, encurtamento do canal mandibular, falha pós-cirúrgica da remodelação, deposição óssea subperiosteal, existência de escleroses e/ou osteólises e aumento da densidade óssea (Arce K. et al. 2009; Torres et al., 2012). No entanto, os achados radiográficos são considerados inespecíficos para caracterizar a MRONJ.

Os estágios iniciais da doença apresentam grau limitado de descalcificação, que são pouco percebidos em análises radiografias bidimensionais, como periapicais e panorâmicas. Estudos têm mostrado que as radiografias panorâmicas são inadequadas para a definição do diagnóstico da doença, sendo necessária a associação de outros exames complementares (Peer et al., 2016). Dessa forma, as técnicas bidimensionais tornam-se insuficientes para o diagnóstico da MRONJ; apresentando determinada significância na prevenção contra a ocorrência de exposição e de necrose óssea em futuros sítios de desenvolvimento (Ruggiero et al., 2015).

Não há evidência de que haja uma técnica imagiológica padrão ouro para o planejamento terapêutico da MRONJ (Peer et al., 2016). No entanto, há um crescente investimento em pesquisas que buscam aprimorar a compreensão da morfologia óssea envolvendo a microtomografia computadorizada de alta resolução (microCT). Portanto, a tomografia computadorizada (CT) apresenta-se como o método imagiológico de maior sensibilidade para avaliação das alterações ósseas, por meio da obtenção de imagens de alta resolução (Arce, Assael, Weissman & Markiewicz, 2009; Chiandussi et al., 2006; Treister, Friedland & Woo, 2010).

Alguns estudos relatam que o aumento da densidade do osso alveolar pode ser considerado um fator de risco a MRONJ (Takaishi et al., 2010). Por meio de mensurações tomográficas dos valores relativos ao osso esponjoso, outros trabalhos

verificaram que essa avaliação se mostra relevante para a detecção dos estágios iniciais da doença (Hamada et al., 2014). Uma pesquisa recente verificou que os valores da tomografia computadorizada, referentes ao osso esponjoso em áreas afetadas e também, em áreas sadias de pacientes acometidos, mostraram-se significativamente maiores do que aqueles encontrados no grupo controle – áreas não afetadas (Taniguchi et al., 2016).

A tomografia computadorizada cone beam (CBCT) destaca-se pela utilização de baixas doses de radiação, simples manipulação e acessibilidade de custo, quando comparada a tomografia convencional (Torres et al., 2012). Assim como as técnicas bidimensionais, as tridimensionais também apresentam características inespecíficas quanto ao diagnóstico da MRONJ; todavia, os padrões ósseos de mineralização são captados com maior sensibilidade (Ruggiero et al., 2015). Portanto, permitem uma apuração mais adequada de áreas locais de esclerose, alterações na lamina dura, presença de reação periosteal e formação precoce de sequestro ósseo, por exemplo. Além disso, a CBCT abrange uma ampla área de interesse, obtendo os resultados com maior rapidez, quando comparada a investigação histomorfométrica; além de possibilitar a medição do grau de mineralização do tecido ósseo (Bouxsein et al., 2010, Junquera et al., 2014).

A microtomografia computadorizada de alta resolução (microCT), além de ser uma técnica não invasiva, possui habilidade de mostrar características morfológicas detalhadas do tecido ósseo, de maneira acurada. Este recurso tecnológico oferece dados reprodutíveis em três dimensões que permitem comparações da situação em que esse tecido se encontra antes e após a aplicação do medicamento, sendo considerada uma ferramenta promissora para estudar a MRONJ. Além disso, a microCT pode produzir uma imagem significativamente menor que a da tomografia computadorizada. Assim, a microCT tem

sido utilizada em modelos animais para avaliar alterações ósseas associadas a MRONJ (Bi et al, 2010; Howie et al., 2015). Essa é a melhor técnica imaginológica para a avaliação da morfologia e da microarquitetura óssea em ratos e em outros animais de pequeno porte utilizados em modelos animais.

Diversos estudos utilizaram a exodontia de dentes em modelos animais tratados com altas doses de bifosfonatos, na tentativa de reproduzir os achados clínicos e radiográficos da MRONJ em humanos. No entanto, a patofisiologia da doença continua incerta (Abtahi, Agholme, Sandberg & Aspenberg, 2012; Allen & Burr, 2008; Ali-Erdem et al., 2011; Bi et al., 2010; Biasotto et al., 2010; Hokugo et al., 2010; Huja et al., 2011; Kobayashi et al., 2010; Marino et al., 2012; Perilli et al., 2010; Senel et al., 2010; Aghaloo et al., 2011; Howie et al., 2015; Zandi et al., 2016).

O presente estudo foi construído para mensurar alterações ósseas em um modelo animal de MRONJ. Com base no pressuposto que alterações ósseas ocorram previamente ao trauma indutor da MRONJ, após a administração do medicamento, optou-se por realizar uma avaliação longitudinal, em três tempos distintos: tempo inicial (T_0), após administração do ácido zoledrônico (T_1) e após a extração dentária, que se constituiu no trauma localizado indutor da doença (T_2). Este estudo, além de avaliar alterações ósseas precoces da MRONJ, discute as dificuldades no desenvolvimento do modelo animal, com o intuito de subsidiar novos trabalhos nessa área.

2. Materiais e Métodos

2.1 Aspectos éticos

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (CEUA) em 18 de março de 2015, sob o protocolo UnBDOC número 5772/2015. Os experimentos seguiram os guias ARRIVE, do National Institutes of Health guide

for the care and use of Laboratory animals (NIH); assim como as convenções da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (COBEA).

2.2 *Design do estudo*

2.2.1 *Animais*

A amostra compreendeu 40 ratas fêmeas (*Rattus norvegicus*). A idade média inicial dos animais era de 30 dias de idade, e o peso aproximado era de 180g. Os animais foram randomicamente selecionados e dispostos em gaiolas de polipropileno (4 por gaiolas), com temperatura de $23^{\circ}\pm 2^{\circ}$ e 12h de ciclo claro/escuro. Ração e água foram fornecidos com livre acesso aos animais. Após 2 semanas de aclimatização, as ratas foram randomicamente divididas em 2 grupos: grupo ácido zoledrônico (ZA) e grupos controles. Elas foram anestesiadas e sedadas (cloridrato de cetamina 10%, 90 mg/kg; cloridrato de xilazina 2%, 15 mg/kg) quando necessário à condução dos experimentos.

2.2.2 *Medicação*

Animais do grupo ZA receberam Zometa® 4mg/5ml (Novartis, Pharma, Basel, Switzerland), 66 µg/kg (Figura 1). Os animais do grupo controle receberam uma solução salina em volume similar. As ratas foram pesadas antes de cada fase experimental para a correta dosagem da droga a ser administrada e também para controlar a perda e o ganho de peso durante o estudo. A administração do medicamento foi feita via injeções intraperitoneais, 3 vezes por semana, durante 3 semanas. Esse protocolo foi testado previamente em um estudo piloto.

2.2.3 Extrações dentais

Extrações dentais foram realizadas nos animais de ambos os grupos (ZA e controle), 3 semanas após o início da terapia com bifosfonatos. Os animais foram previamente anestesiados com cloridrato de cetamina (60mg/kg) e com cloridrato de xilazina 2%(7mg/kg). Os primeiros molares inferiores esquerdos foram extraídos sob anestesia pelo mesmo operador nos dois grupos, com o uso de um instrumento similar ao descolador Molt. Após o procedimento, os animais foram cuidadosamente assistidos, com a administração de analgésico 2 vezes ao dia, por 2 dias (tramadol, 60mg/kg/dia). Os animais foram pesados 2 vezes por semana durante as semanas seguintes. Foram observado o comportamento, a habilidade de se alimentarem e a presença de injúrias na região oral.

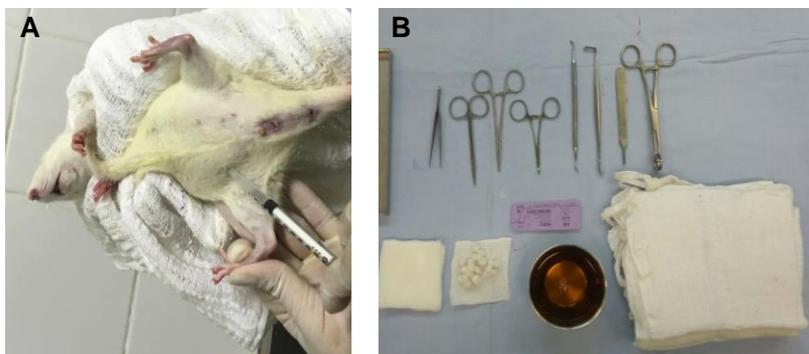


Figura 1 – A - Via de administração (intraperitoneal) da medicação testada e da droga analgésica. B - Preparação do instrumental, utilizando gazes, bolinhas de algodão, clorexidina, fio de sutura Vicryl® e compressas para montagem da mesa cirúrgica.



Figura 2 - A- Droga anestésica (cloridrato de cetamina 60mg/kg) e sedativo (cloridrato de xilazina 2% 7mg/kg). Exodontia do primeiro molar inferior esquerdo: B- Posicionamento do animal para iniciar o procedimento seguido de sindesmotomia dos tecidos gengivais. C- Luxação do dente.

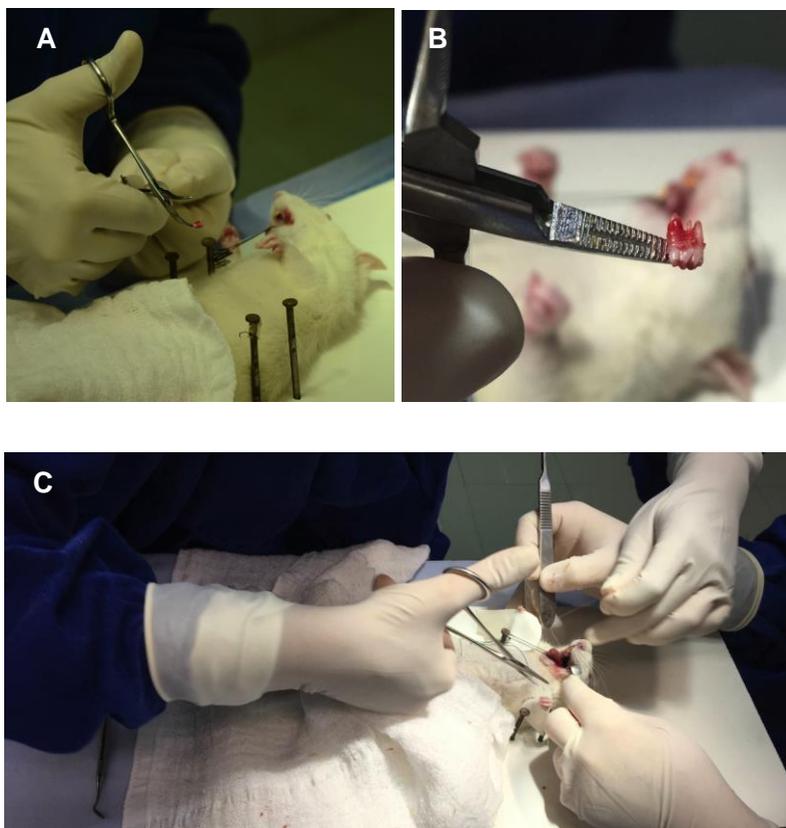


Figura 3 – Exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. A e B – Análise do dente após extração. C – Síntese dos tecidos.



Figura 4 - Reposicionamento do animal para a posição decúbito lateral, a fim de promover a recuperação de apneia no transoperatório, fato ocorrido com frequência durante o procedimento.

2.2.4 Exame visual

Análises clínicas foram feitas por um mesmo examinador em uma sala iluminada, com o objetivo de visualizar a presença de osso exposto, abscesso ou fístula durante as 3 fases do experimento (T_0 , T_1 e T_2).

2.2.5 Acesso microtomográfico

A microCT foi realizada utilizando o aparelho in vivo SkyScan 1076 device (Bruker, Kontich, Belgium). Os parâmetros técnicos foram: 100 kV, 100 μ A, tamanho de pixel 18 μ m; espessura do filtro de alumínio Al 1.0 mm, passo de rotação de 0.44, média de 5 quadros por passo, com 37 minutos de escaneamento total. As imagens tridimensionais foram reconstruídas no programa NRecon, (1.6.9 version, Bruker, Kontich, Belgium) com as seguintes correções: artefato em anel (14°), suavização (1 nível) e o endurecimento do feixe (55%). Assim, o estudo compreende 3 diferentes fases experimentais por meio da avaliação com a microCT:

- T₀: O primeiro exame na microCT ocorreu no dia 0, anterior a medicação e as extrações para as análises qualitativas e quantitativas prévias das alterações ósseas, avaliando o osso no estágio inicial.
- T₁: A segunda avaliação microtomográfica foi realizada após 3 semanas de medicação de modo a investigar as alterações ósseas associadas a terapia com o ácido zoledrônico, anterior ao procedimento cirúrgico.
- T₂: A última tomada da microCT foi adquirida 6 semanas após a extração para avaliar as alterações ósseas relacionada a osteonecrose dos maxilares.

As imagens foram analisadas nos *softwares* Dataviewer (V 1.5.0, versão 64 bit, Bruker) e CTAn (V 1.13, versão 64 bit, Bruker) por um radiologista experiente sem o conhecimento das análises clínicas, em ambiente apropriado e com controle da luminosidade. O equipamento para visualização das imagens foi o monitor Dell UltraSharp™ U2410, 24 polegadas, Dell, Rio Grande do Sul, Brasil. Uma área tridimensional de volume de interesse (VOI) com diâmetro de seção de 561.2 μm e espessura de 540 μm (30 cortes tomográficos), localizada abaixo da raiz mediana do primeiro molar entre a cortical lingual e o canal mandibular foi definida para o lado direito e esquerdo da mandíbula (Figura 5). Em relação a análise microtomográfica quantitativa, dentro do VOI estabelecido, alguns parâmetros estruturais ósseos foram calculados de acordo com autores prévios e estes foram: densidade mineral óssea (BMD), espessura trabecular (Tb.Th) e volume de osso por fração (BV/TV) (Bouxein et al., 2010; Junquera et al., 2014; Lee et al., 2017) (Tabela 1).

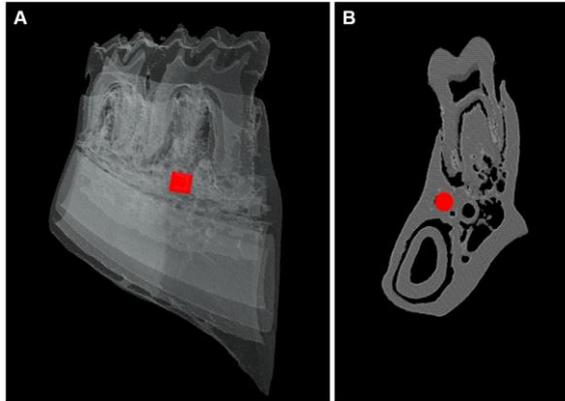


Figura 5 – Reconstrução de imagens microtomográficas em 3D da área correspondente ao selecionado Volume de Interesse - VOI no osso mandibular de um dos animais da amostra. A – Vista lateral 3D mostrando o VOI determinado. B – Imagem coronal 3D do VOI.

O mesmo examinador também registrou os achados qualitativos da microCT associados com MRONJ: destruição cortical, reação periosteal e sequestro ósseo. Os animais de cada grupo foram eutanasiados após a fase T₂, por meio de exposição ao gás isoflurano e ao CO₂.

2.2.6 Análise da presença de restos radiculares, de lesão periapical

Foi feita a constatação da presença de restos radiculares no alvéolo, durante a análise clínica do dente após a extração, sendo confirmada por meio da análise microtomográfica. Foi avaliada também por meio da microtomografia, a presença de lesões periapicais próximas ao sítio da extração.

2.3 Análise estatística

Todas as análises foram feitas no programa Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Um valor p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Uma análise descritiva foi apresentada para os parâmetros dos dados da microCT, baseados nos grupos, fase de acesso e lado da mandíbula. Devido à realização completamente randômica do experimento, os dados foram avaliados por meio de testes paramétricos. A análise fatorial de variância (ANOVA) para medições repetidas foi utilizada para comparar os grupos durante as 3 fases experimentais, seguidos do teste de acompanhamento de LSD-Fisher, no caso de significância estatística. O teste qui quadrado foi utilizado na comparação qualitativa das variáveis entre os grupos ZA e controle (Gráfico 1).

3. Resultados

A amostra inicial era composta por 40 animais. No entanto, 4 animais foram excluídos do estudo devido a artefatos no escaneamento da microCT. Além disso, após o procedimento cirúrgico, 6 animais morreram. Assim, a amostra final compreendeu 30 animais, 13 do grupo controle e 17 do grupo tratado com ZA. O peso não variou significativamente entre os animais de ambos os grupos durante o experimento.

3.1 Acesso clínico visual

As características clínicas dos animais estudados foram apenas detectadas na última fase de experimentos (T_2), após as extrações dentais, não havendo detecção dessas nas fases anteriores. Nenhum dos animais no grupo controle apresentou exposição óssea. No entanto, 14 animais (78%) do grupo ZA apresentaram sinais clínicos característicos da MRONJ ($p < 0.001$, chi-square). Abscessos e fístulas também foram encontrados apenas no grupo experimental, especificadamente

em 3 animais (18%, $p = 0.110$, chi-square). A figura 6 apresenta um exemplo de exposição óssea e fístula detectados em um animal do grupo zoledronato na terceira fase experimental (T_2).

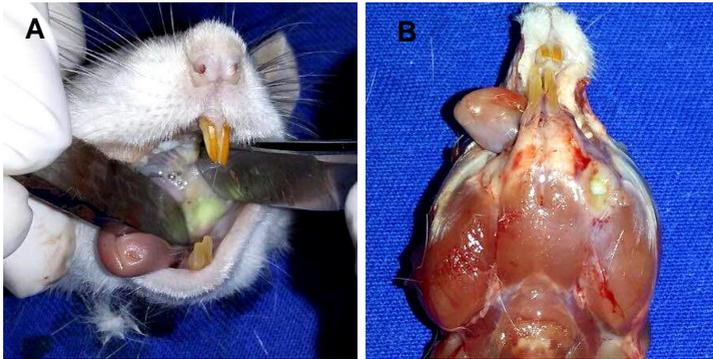


Figura 6 – Acesso visual dos sinais clínicos da MRONJ em um animal do grupo zoledronato. A- Um acesso intraoral *in vivo* mostra a exposição de osso necrótico com uma fístula intraoral. B- Vista macroscópica do animal dessecado demonstrando a área extraoral de necrose óssea no lado esquerdo da mandíbula (próximo ao local da extração dental).

3.2 Comparação dos parâmetros estruturais ósseos no lado esquerdo mandibular (área supostamente afetada) entre o grupo ZA e o grupo controle

A Tabela 2 apresenta a comparação dos valores médios dos parâmetros avaliadas pela microCT, no lado esquerdo mandibular (área afetada) do grupo ZA e do grupo controle

A média dos valores da BMD apresentaram um aumento durante a avaliação das 3 fases experimentais em ambos os grupos ZA e controle. No lado esquerdo mandibular, local onde foram feitas as extrações, foi observado a mesma tendência a valores aumentados em relação a BMD no grupo ZA, do que no grupo controle. Entretanto, essa diferença não se mostrou estatisticamente significativa.

Os valores de Tb.Th apresentaram um aumento de T_0 a T_2 no grupo ZA, embora não tenham apresentado variações durante as 3 fases no grupo controle. Após a extração (T_2), Tb.Th apresentou um valor consideravelmente maior no grupo ZA do que no grupo controle.

O parâmetro BV/TV encontrou-se aumentado durante todas as fases do estudo em ambos os grupos ZA e controle. No entanto, em T_2 esses valores apresentavam-se significativamente mais elevados no grupo ZA do que no grupo controle.

3.3 Comparação dos parâmetros estruturais ósseos do lado direito mandibular (área não afetada) do grupo ZA e do grupo controle

A Tabela 3 apresenta a comparação dos valores médios de todas as estruturas ósseas avaliadas pelos parâmetros determinados na microCT, no lado direito mandibular (área não afetada) do grupo ZA e do grupo controle.

Em ambos os grupos, os valores médios de BMD foram maiores em T_2/T_1 quando comparados com T_0 . Embora haja uma alta tendência de maiores valores de BMD no grupo ZA, não foram encontradas diferenças significativas entre os valores médios de BMD no lado direito, dentro do grupo ZA e do grupo controle, para cada fase experimental (T_0 , T_1 e T_2).

Os valores de Tb.Th de T_1 e T_2 aumentaram no grupo ZA, mas não apresentaram alterações no grupo controle durante as 3 fases do experimento. No momento T_2 , Tb.Th mostrou-se significativamente mais alto no grupo ZA do que no grupo controle.

O parâmetro BV/TV apresentou um aumento de T_0 a T_1 , em ambos os grupos. No entanto, em T_2 essa medição encontrou-se notadamente maior no grupo ZA.

3.4 *Comparação dos parâmetros estruturais óssos no lado esquerdo e no lado direito da mandíbula do grupo ZA e do grupo controle.*

No grupo controle, os valores médios de BMD apresentaram-se elevados no local da extração quando comparado ao lado direito, em que não foi submetido a essa intervenção. No grupo tratado, o sítio de extração também apresentou valores elevados referentes a BMD, quando comparados com o lado direito.

Apenas em T_2 , os valores médios de Tb.Th do lado esquerdo mostraram-se consideravelmente maiores do que os valores do lado oposto em ambos os grupos teste e controle.

No lado em que foi feita a extração, os valores médios de BV/TV, em T_2 , foram notadamente elevados quando comparados ao lado direito, nos grupos ZA e controle.

A interação de todas as variáveis estudadas (diferentes fases experimentais, grupos avaliados, e lados da mandíbula) foi avaliada em conjunto. (Gráfico 1).

3.5 *Acesso microtomográfico visual*

As características visuais microtomográficas dos animais estudados foram detectadas apenas após as extrações (T_2). A frequência da destruição do osso cortical foi significativamente maiores no grupo ZA (41%, 7 animais), comparando-se com o grupo controle (8%, 1 animais). A reação periosteal foi apenas observada no grupo ZA (35%, 6 animais). Um animal do grupo ZA (6%) apresentou sequestro ósseo na área afetada por MRONJ (Tabela 4). A Figura 8 exemplifica uma lesão óssea no lado esquerdo de um animal do grupo zoledronato, que apresenta intensa reação periosteal. As demonstrações visuais do acesso microtomográfico em 3 diferentes fases, observados na figura 7, reforça que as mudanças visuais foram detectadas somente em T_2 (Tabela 7).

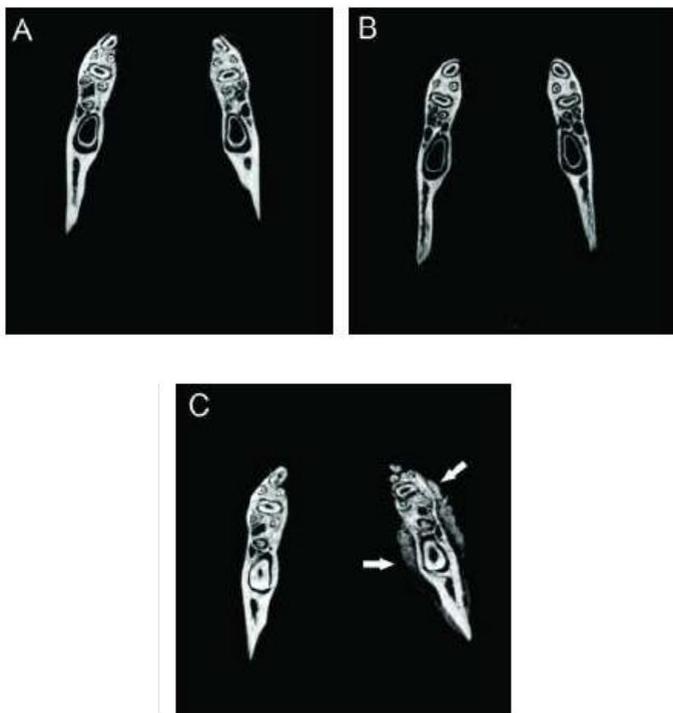


Figura 7 – Imagens microtomográficas axiais em três diferentes fases de avaliação mostrando que as lesões ósseas foram detectadas apenas após a extração dental (T_2) em um animal do grupo zoledronato. A- Primeiro acesso micotomográfico em T_0 , evidenciando normalidade do tecido ósseo. B- Segundo acesso micotomográfico, não revelando alterações ósseas qualitativas após a administração do zoledronato e anterior a realização do trauma local. C- Presença de reação periosteal e de lesões osteolíticas visualizadas após a extração dental (T_2). As mudanças visualizadas na estrutura óssea são achados tomográficos referentes a MRONJ.

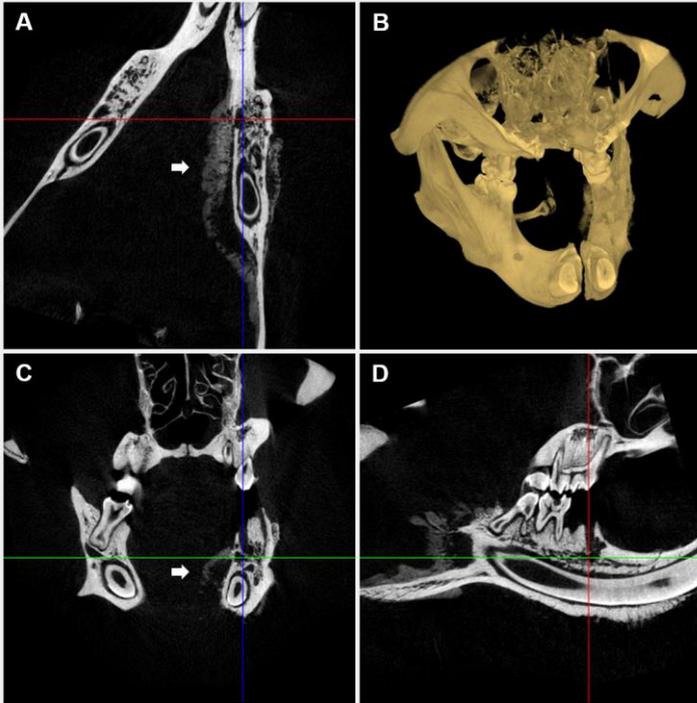


Figura 8 - Reconstrução multiplanar de imagens (A, C e E) e Imagens 3D (B, D e F) de microtomografia computadorizada mostrando lesões osteolíticas e reação periosteal em um animal do grupo zoledronato (flechas brancas). A – Corte coronal. B – Vista frontal em 3D. C- Corte axial. D – Vista axial em 3D. E – Corte sagital. F – Vista sagital em 3D.

3.6 Análise da presença de restos radiculares, de lesão periapical

Todos os animais do grupo controle apresentaram restos radiculares no alvéolo após o procedimento de exodontia. No grupo zoledronato 16 animais (94%) apresentaram remanescentes dentários no alvéolo. Além disso, 10 animais do grupo controle (77%) apresentaram a presença de lesões periapicais e essa condição foi constatada em 7 animais do grupo zoledronato (41%) (Tabela 5).

3 Discussão

Esse é um estudo pioneiro em avaliar aspectos clínicos e microtomográficos relacionados às alterações ósseas envolvidas na MRONJ, por meio de uma avaliação longitudinal. Na análise inicial (T_0), na avaliação após a administração do zoledronato anterior a exposição ao trauma (T_1) e na análise após a realização do procedimento cirúrgico (T_2). Os índices quantitativos averiguados foram BMD, BV/TV e Tb.Th. A avaliação no tempo inicial permitiu a confirmação da normalidade em cada grupo estudado. Diante do segundo tempo de avaliação foi possível identificar alterações ósseas precoces por meio da análise quantitativa dos parâmetros microtomográficos. Por fim, a terceira avaliação confirmou a presença de alterações ósseas no grupo experimental, além de ressaltar o papel da extração dentária no desencadear da doença,

Em relação aos parâmetros microtomográficos escolhidos para esse estudo; BMD, BV/TV e Tb.Th foram selecionados para embasar as análises. O BMD é influenciado pela idade, forças oclusais e hábitos alimentares, sendo uma avaliação primordial para o entendimento da osteonecrose (Liu et al., 2016, Tohashi et al., 2016). Tohashi et al. (2010) cita que um aumento no BMD mandibular está associado a MRONJ. Além disso, esse parâmetro na região mandibular pode ser um potencial marcador na predição do risco a MRONJ, antes mesmo da ocorrência de intervenções cirúrgicas em pacientes tratados com agentes antirreabsortivos.

O volume de osso por fração de tecido (BV/TV) foi selecionado como parâmetro pela capacidade de refletir os ganhos e as perdas ósseas. O BV/TV é mensurado por porcentagem (%) e representa a verdadeira quantidade de osso na determinada área de estudo, apresentando valores elevados em ossos osteonecróticos, quando comparados aos valores de um osso em estado de normalidade. A espessura trabecular

(Tb.Th) determina a média da largura da estrutura óssea. A espessura trabecular apresenta maiores valores em um osso necrótico quando comparado com um sadio, evidenciando ainda valores reduzidos na porção inferior do tecido (Junquera et al., 2014).

Após a extração dentária (T_2), os aspectos clínicos e microtomográficos qualitativos da MRONJ foram encontrados pela primeira vez, apesar da análise quantitativa na microCT ter sido realizada anteriormente em T_1 . A frequência de exposição óssea, destruição do córtex mandibular, sequestro ósseo e reação periosteal mostraram-se significativamente maiores no grupo ZA do que no grupo controle. De acordo com Ruggiero et al. (2014), essas características são sinais clínicos e radiográficos da MRONJ que são perceptíveis nos pacientes.

O aumento dos valores do BMD foi observado durante todas as fases experimentais tanto na área afetada do grupo ZA (lado esquerdo), quanto no grupo controle. No entanto, para cada fase do experimento, nenhuma diferença relevante foi encontrada comparando-se o grupo ZA com o grupo controle. Os resultados também permitiram a comparação dos parâmetros estruturais ósseos do lado esquerdo com o lado direito da mandíbula no grupo ZA e no grupo controle. No grupo controle, a média dos valores do BMD foram elevadas nas áreas onde ocorram as extrações (lado esquerdo – 0,704), enquanto que no lado direito foram relativamente inferiores (0,492). No grupo ZA, a área supostamente afetada (sítio da extração), também apresentou médias elevadas dos valores relativos a BMD quando comparado ao lado direito. Desse modo, os resultados referentes ao aumento da densidade mineral mostraram-se correspondentes com a literatura (Takaishi et al, 2010, Tanigushi et al, 2016, Junquera et al., 2014, Tohashi et al, 2016).

Um estudo recente também verificou que um aumentado valor de BMD mandibular pode estar associado a MRONJ em pacientes (Tohashi et al, 2016). Os autores ressaltaram que essa

medição tem um potencial papel marcador da doença, sendo importante na predição do risco de MRONJ em pacientes sob a administração de agentes antirreabsortivos. Esse fato foi citado anteriormente por Takaishi et al, 2010.

No entanto, esse estudo demonstrou que o aumento substancial dos valores de BMD no grupo zoledronato resulta em uma alteração microestrutural óssea precoce, que pode ser detectada já na fase T_1 . Outro estudo quantifica a densidade mineral óssea e a arquitetura trabecular em áreas de sequestro ósseo em dois pacientes sob o uso de BFs. Desse modo, os autores encontraram valores de BMD elevados na região do sequestro; assim como ocorrido no presente estudo. Além disso, evidenciaram valores aumentados nos parâmetros referentes ao número e à espessura trabecular, enquanto que obtiveram valores reduzidos no parâmetro separação trabecular (Junquera et al, 2014). Em outro estudo os autores evidenciaram significativa redução na espessura trabecular e aumento na separação trabecular, indicando acentuada deterioração na integridade óssea por meio da indução da MRONJ em ratos que apresentaram doença metabólica seguida de ovariectomia (Kim et al., 2015).

Na fase T_2 da avaliação, os valores de BMD mostraram-se consideravelmente elevados no grupo zoledronado quando comparado ao grupo controle, comparando ambos os lados da mandíbula. Esses resultados são compatíveis àqueles encontrados em um estudo prévio com camundongos, em que o mesmo aumento no BMD fora detectado (Vermeer et al., 2016). Um outro estudo também verificou que esse parâmetro aumentado na mandíbula pode estar associado a MRONJ em pacientes (Tohashi et al., 2016). Além disso, esses autores relataram que o BMD mandibular serve como marcador para a predição do risco a MRONJ em pacientes sob terapia a base de medicamentos antirreabsortivos. No entanto, os achados do presente estudo confirmam que a presença desse parâmetro

com valores elevados no grupo ZA se caracteriza como uma mudança estrutural tardia, sendo detectada apenas, após a extração dental (T_2).

A espessura trabecular aumentou de T_0 para T_1 , e também de T_1 para T_2 no grupo ZA, embora o grupo controle tenha apresentado um aumento do Tb.Th apenas de T_1 para T_2 . Após a extração (T_2), Tb.Th mostrou-se substancialmente elevado em ambos os grupos ZA e controle. Desse modo, os resultados evidenciam alterações ósseas precoces por meio de parâmetros microtomográficos que são correspondentes com a literatura (Takaishi et al, 2010, Tanigushi et al, 2016, Junquera et al., 2014, Tohashi et al, 2016). Comparando os lados direito com o esquerdo, apenas em T_2 , os valores de Tb.Th para o lado esquerdo mostraram-se notadamente maiores que os do lado direito em ambos os grupos teste e controle.

Junquera et al., (2014) relatou que o volume de osso por fração BV/TV, mensurado por porcentagem (%), representa a verdadeira quantidade de osso na área estudada e que esse valor é comumente alto em osso osteonecrótico quando comparado com o osso saudável. Nesse estudo, os autores utilizaram amostras com sequestro ósseo associado a implantes dentais, e também evidenciaram, que a espessura trabecular apresentava altos valores em um osso necrótico do que em um sadio, encontrando ainda, valores reduzidos na porção inferior do tecido.

No sítio da extração, na fase T_2 , os valores médios de BV/TV foram consideravelmente maiores em ambos os grupos ZA e controle do que os valores desse mesmo parâmetro na avaliação do lado direito. Além disso, a interação conjunta de todas as variáveis do estudo (diferentes fases experimentais, grupos avaliados e sítios da mandíbula) não apresentou diferenças ($p>0,05$). Desse modo, esses resultados também se mostram ao encontro dos achados na literatura (Tanigushi et al, 2016, Tohashi et al, 2016, Junquera et al, 2016).

No presente estudo, Tb.Th e BV/TV dos grupos tratados nas fases T_1 e T_2 apresentaram os valores mais expressivos. Além disso, esse aumento foi encontrado em T_2 , no grupo tratado e no lado esquerdo (local das extrações). Mais estudos poderão elucidar se esses parâmetros ósseos podem ser considerados como preditores da MRONJ. Junquera et al. (2014) concluiu que as características diretas e indiretas de um tecido ósseo submetido a MRONJ apresentam elevado BV/TV, número e espessura trabecular e, em contrapartida, mostram uma redução na separação trabecular, reafirmando os achados propostos por esse trabalho.

Os parâmetros quantitativos que teriam sido alterados após a administração da medicação (T_1) apresentaram o mesmo comportamento em T_2 . Estudos anteriores evidenciaram diferenças metodológicas significativas que limitaram a comparação com os resultados do presente estudo. Além disso as diferentes regiões de interesse e também as possíveis diferenças entre estudos em animais e em humanos podem explicar os resultados conflitantes do presente estudo com os supracitados.

O presente estudo possui atributos e limitações. Apesar da inovação na avaliação clínica e microtomográfica *in vivo* da MRONJ, o processamento histológico não foi feito. No entanto, a análise tridimensional do complexo estrutural trabecular mostrou-se substancial na contraposição às limitações histológicas e radiológicas da técnica bidimensional (Junquera et al., 2016, Bouxien et al., 2010).

Um fator limitante foi a utilização de ratas jovens para o desenvolvimento do modelo. O experimento iniciou-se com ratas possuindo um mês e meio de vida e foi finalizado com ratas de meia idade, apresentando 4 meses de vida. A imaturidade etária desses animais reflete-se na limitada abertura bucal, um fator que dificulta a visualização do operador e a realização das extrações (Zecchin et al., 2007). Em relação aos achados

microtomográficos, houve uma alta frequência de reação periosteal no grupo zoledronato. Entretanto, a prevalência dessa alteração mostra-se baixa em pacientes (Allen et al., 2015), provavelmente devido a ocorrência da MRONJ ser mais frequente em pacientes idosos (Ruggiero et al., 2014). Portanto, a idade imatura dos ratos da amostra pode ter influenciado esses resultados no estudo.

Em pacientes jovens, o periósteo mostra-se mais ativo e menos aderente ao córtex do que em adultos. Desse modo, a reação periosteal ocorrida no decorrer do experimento é provavelmente relacionada a intensidade, agressividade e duração do processo inflamatório relacionados a MRONJ. A disseminação dessa inflamação subperiosteal estimula a neoformação óssea em torno do córtex mandibular (Rana, Wu & Eisenberg, 2009). Em um estudo recente feito com roedores, os aspectos pró-inflamatórios do tratamento crônico com zoledronato foram traçados no periósteo mandibular. A análise histológica comprovou a infiltração de leucócitos advindos da zona necrótica adjacente no tecido periosteal (Janovsky et al., 2015). Desse modo, a idade precoce dos animais pode ter influenciado os parâmetros microtomográficos, principalmente aqueles que mensuram a densidade mineral óssea. No entanto, possibilitou a avaliação longitudinal proposta pelo design do estudo.

Dentre os 40 animais inicialmente selecionados para compor a amostra, houve a perda de animais durante o processar do experimento. Essa situação também é vista em outros estudos, apesar de haverem poucos relatos sobre a existência de intercorrências durante o desenvolvimento dos modelos. Torna-se evidente a ausência de uma padronização metodológica referente aos protocolos de intervenção no estudo da MRONJ. Esse fato é comprovado pelos modelos animais previamente desenvolvidos que seguem diferentes protocolos para dosagem, intervalo entre medicações, duração da terapia e via de

administração dos BFs na tentativa de indução da BRONJ, como exemplificado na tabela 6. Zandi et al. (2016) evidência a importância de um protocolo viável e reproduzível para a indução da MRONJ, a fim de aprimorar novas estratégias preventivas e terapêuticas. Além disso, poucos estudos utilizaram parâmetros microtomográficos no entendimento da osteonecrose nesses modelos.

A dificuldade técnica durante o procedimento cirúrgico, também é elencada como um fator limitante. No presente estudo esse fator é exemplificado pelo tempo de extração reduzido, devido a apneia causada pelo sedativo aplicado nos animais antes da cirurgia. Além disso, alia-se a dificuldade respiratória causada pela posição supina e pela manipulação lingual durante a concretização do procedimento, como visto na figura 4. Dessa forma, esse quadro gerou sucessivas interrupções durante a cirurgia, para posicionar as ratas lateralmente e possibilitar suas recuperações, além de se fazer necessário a aplicação de massagens torácicas para auxiliar a reanimação.

O tamanho diminuto e a anatomia radicular dos dentes dos ratos contribuíram para aumentar a complexidade do procedimento. Durante a extração dos primeiros molares há um risco considerável de ocorrer a extração de dentes adjacentes. Segundo Zecchin et al. (2007), a possibilidade de extração acidental do segundo e, principalmente, do terceiro molar podem acarretar em uma hemorragia fatal. Ademais a isso, as raízes dentárias desses animais apresentam dilacerações que dificultam a exodontia dos dentes por completo, propiciando a permanência de raízes ou de restos radiculares no interior do alvéolo considerando também, a impossibilidade de remoção desses fragmentos. Pacheco et al. (2015) ressalta a dificuldade da remoção cirúrgica do dente e descreve a ocorrência de fratura apical em todos os animais dos grupos controle e experimental de seu estudo. Além disso, interliga essa condição ao processo inflamatório/ infeccioso presente na área do trauma. Os demais

modelos animais que realizaram análise radiográfica ou tomográfica não relataram a dificuldade na extração ou não citaram se houve permanência de restos radiculares, ainda que estas pudessem ser visualizadas nas imagens do artigo (Kim et al., 2015).

A presença desses componentes dentários pode ter relação com o desenvolvimento de lesões periapicais encontradas na análise microtomográfica de alguns animais, entretanto, essas lesões não são sinais indicativos da MRONJ (tabela 5). De acordo com Neville et al. (2009) são causadas por um processo inflamatório decorrente de um foco infeccioso como, por exemplo, a presença de restos radiculares e a indução ao trauma. Isso é evidenciado pela distribuição uniforme das lesões periapicais nos grupos ZA e controle, comprovando não ser um sinal da MRONJ e sim, um fator potencializador ao desenvolvimento da doença.

Apesar das adversidades, o modelo animal proposto foi efetivo na indução da MRONJ por meio da administração do ácido zoledrônico, seguida da intervenção cirúrgica. Após a extração dental (T_2), 78% dos animais do grupo ZA apresentaram MRONJ. Essa frequência está de acordo com os estudos prévios na literatura (Zandi et al., 2016; Jang, Kim & Cha, 2015; Ersan et al., 2014; Howie et al., 2015). As características clínicas e tomográficas foram detectadas somente na fase T_2 .

O presente estudo confirma a relevância da extração dental na indução da MRONJ. As alterações ósseas relacionadas ao desencadear da doença foram primeiramente averiguadas na microestrutura na segunda fase do experimento (T_1), antes do trauma local. A presença de reação periosteal, destruição cortical e sequestro ósseo foram observadas somente após a extração durante a terceira fase de avaliação (T_2). Embora os sinais clínicos e tomográficos obtidos nesse modelo animal tentem simular aqueles encontrados em humanos (Ruggiero et al.,

2014), a elevada frequência da reação periosteal mostra-se particular aos modelos animais (Allen et al, 2015).

Aghaloo et al. (2011) cita a ausência de modelos animais que avaliem os parâmetros relacionados à ocorrência, à progressão e à severidade da MRONJ como os maiores obstáculos ao entendimento da patofisiologia da doença. A limitação técnica dos modelos de estudo em animais não é comumente descrita. Em geral, não há relatos de intercorrências durante a realização das exodontias e poucos trabalhos citam as dificuldades envolvidas nas mesmas. Mostra-se evidente a necessidade da realização de novos modelos animais e do desenvolvimento de técnicas cirúrgicas inovadoras para a exodontia, visando a padronização metodológica para a indução da MRONJ.

Pode-se concluir que o modelo animal proposto para a avaliação da patogenia da MRONJ, em 3 fases, demonstrou que os parâmetros microtomográficos indicativos de alterações ósseas precoces são significativos na definição e na melhor compreensão da patogenia da doença.

Aspectos Ressaltados:

- Parâmetros microtomográficos quantitativos podem melhorar o entendimento da patogenia da MRONJ.
- As alterações ósseas precoces foram detectadas na microtomografia antes procedimento cirúrgico.
- As alterações clínicas e tomográficas da MRONJ foram verificadas apenas após a extração.
- O modelo animal desenvolvido foi efetivo em induzir MRONJ.
- A etapa referente a extração dental é superestimada e há pouco detalhamento da realização do procedimento na literatura. Novos estudos devem ser feitos para

estabelecer novos métodos para a realização da extração dentária em modelos animais.

Agradecimentos:

Esse trabalho foi patrocinado pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP/DF), com o número de concessão: 0193.000971/2015. Os autores responsáveis pelo design do estudo foram: JV, NM, AL, PF. Aqueles encarregados de conduzir o estudo foram JV, AC, AA, SC, SM, HM. A coleta dos dados foi feita por JV, AC, AA, e SM e a análise dos dados realizada por JV, AC, AA, NM, PF, SM, MS, AG e AL. A interpretação dos resultados foi feita por JV, AC, AA, NM, PF, SM, MS, AG, AL e PF. O esboço e a revisão do manuscrito foi encarregada à JV, NM, HM, PF, SC, MS, AG, AL e PF. A aprovação da revisão final foi feita por JV, AC, AA, AL, SC, NM, SM, MS, AG e PF sendo responsáveis pela integridade dos dados analisados. Imagens cedidas por VILARINHO, Josy (2016). Modelo Animal de Osteonecrose Associada ao Uso de Bifosfonato. Avaliação por Microtomografia em três tempos: inicial, intermediária e final.

Referências:

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

Aghaloo, T.A, Kanj, B., Sung, E.C., Shoff, M., Ronconi, M., Gotcher, J.E., Bezouglaia, O., Dry, A.M & Tetradis, S. (2011). Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis

of the jaw in the rat. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26 (8), 1871-1882.

Ali-Erdem, M., Burak-Cankaya, A., Cemil-Isler, S., Demircan, S., Soluk, M., Kasapoglu, C. & Korhan-Oral, C. (2011). Extraction socket healing in rats treated with bisphosphonate: animal model for bisphosphonate related osteonecrosis of jaws in multiple myeloma patients. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirurgia Bucal*, 16, 879-83.

Allen, M.R. & Burr, D. (2008). Mandible matrix necrosis in beagle dogs after 3 years of daily oral bisphosphonate treatment. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 66, 987-94.

Allen, M.R. (2015). Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: Basic and Translational Science Updates. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, 27, 497-508.

Arce, K., Assael, L., Weissman, J., & Markiewicz, M. (2009). Imaging findings in bisphosphonate-related osteonecrosis of jaws. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 67, 75-84.12

Barasch, A., Cunha-Cruz, J., Curro, F.A., Hujoel, P., Sung, A.H., Vena, D. et al. (2011). Risk factors for osteonecrosis of the jaws: a case-control study from the CONDOR dental PBRN. *Journal of Dental Research*, 90, 439-44.

Bi, Y., Gao, Y., Ehirchiou, D., Cao, C., Kikuiru, T., Le, A., Shi, S. & Zhang, L. (2010). Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *American Journal of Pathology*, 177, 280-90.

Biasotto, M., Chiandussi, S., Zacchigna, S., Moimas, S., Dore, F., Pozzato, G., et al. (2010). A novel animal model to study non-

spontaneous bisphosphonates osteonecrosis of jaw. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 39, 390-6.

Chiandussi, S., Biasotto, M., Dore, F., Cavalli, F., Cova, M.A. & Di Lenarda, R. (2006). Clinical and diagnostic imaging of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Dentomaxillofacial Radiology*, 35, 236-243.

Cremers, S. & Papapoulos, S. (2011). Pharmacology of bisphosphonates. *Bone*, 49:42-9.

Damm, D.D.; Neville, B.W. (2009). *Patologia Oral & Maxilofacial*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

Drake, M.T., Clarke, B.L., & Khosla, S. (2008). Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clinic Proceedings*, 83, 1032-45.

Ersan, N., van Ruijven, L.J., Bronckers, A.L., Olgaç, V., Ilgüy, D. & Everts V. (2014). Teriparatide and the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a rat model, *Dentomaxillofacial Radiology*, 43, 20130144.

Graham, R., Russell, G. (2011). Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone* 49, 2-19.

Hokugo, A., Christensen, R., Chung, E., Sung, E., Felsenfeld, A.L., Sayre, J.W., Garrett, N., Adams, J.S. & Nishimura, I. (2010). Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with vitamin D deficiency in rats. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25, 1337-49.

Howie, R., Borke, J., Kurago, Z., Daoudi, A., Cray, J., Zakhary, I.E., Brown, T.L., Raley, J.N., Tran, L.T., Messer, R., Medani, F. &

Elsalanty, M.E. (2015). A model for osteonecrosis of the jaw with zoledronate treatment following repeated major trauma. *PLoS ONE*, 10, e0132520.

Huja, S., Mason, A., Fenell, C., Mo, X., Hueni, S., D'Atri, A.M. & Fernandez, S.A.13 (2011). Effects of short-term zoledronic acid treatment on bone remodeling and healing at surgical sites in the maxilla and mandible of aged dogs. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 69, 418-27.

Jang, H., Kim, J. & Cha, I. (2015). Development of animal model for Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery*, 37, 1-7.

Janovszky, Á., Szabó, A., Varga, R., Garab, D., Boros, M., Mester, C. et al. (2015). Periosteal microcirculatory reactions in a zoledronate-induced osteonecrosis model of the jaw in rats. *Clinical Oral Investigations*, 19, 1279-88.

Junquera, L., Pelaz, A., Gallego, L., García-Consuegra, L. & Costilla, S. (2014). Bisphosphonate-related osteonecrosis associated with dental implants: a microcomputed tomography study. *Implant Dentistry*, 23, 258-63.

Kim, J.W., Tatad, J.C., Landayan, M.E., Kim, S.J. & Kim, M.R. (2015). Animal model for medication-related osteonecrosis of the jaw with precedent metabolic bone disease. *Bone*, 81, 442-8.

Kobayashi, Y., Hiraga, T., Ueda, A., Wang, L., Matsumoto-Nakano, M., Hata, K., Yatani, H. & Yoneda, T. (2010). Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing

osteonecrosis of the jaw, in mice. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 28, 165-75.

Marino, K., Zakhary, I., Abdelsayed, R., Carter, J., O'Neill, J.C., Khashaba, R.M., Elsalanty, M., Stevens, M.R. & Borke, J.L. (2012). Development of a rat model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Journal of Oral Implantology*, 38, 511-8.

Marx, R. (2003). Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 61, 1115-7.

Pacheco, V.N., Langie R., Etges A., Ponzoni D., & Puricelli, E. (2015). Nitrogen Containing Bisphosphonate therapy: assessment of the alveolar bone structure in rats – a blind randomized controlled trial. *International Journal of Experimental Pathology*, 96, 255-260.

Perilli, E., Le, V., Ma, B., Salmon, P., Reynolds, K. & Fazzalari, N.L. (2010). Detecting early bone changes using in vivo micro-CT in ovariectomized, zoledronic acid-treated, and sham-operated rats. *Osteoporosis International*, 21, 1371-82.

Ponte, F.S., Catalfamo, L., Micali, G., Runci, M., Cutroneo, G., Vermiglio, G., Centofanti, A. & Rizzo G. (2016). Effect of bisphosphonates on the mandibular bone and gingival epithelium of rats without tooth extraction. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 11, 1678-1684.

Rasmusson, L. & Abtahi, J. (2014). Bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw: an update on pathophysiology, risk factors, and treatment. *International Journal of Dentistry*, 2014, 471035.

Ruggiero, S., Dodson, T., Fantasia, J., Goodday, R., Aghaloo, T., Mehrotra, B., et al. (2014). Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw - 2014 Update. *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 72, 1938-56.

Saad F, Brown JE, Van Poznak C, Ibrahim T, Stemmer SM, Stopeck AT, Diel IJ, Takahashi, S., Shore, N., Henry, D.H., Barrios, C.H., Facon, T., Senecal, F. et al. (2012). Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. *Annals of Oncology*. 23, 1341-7.

Senel, F., Duman, M., Muci, E., Cankaya, M., Pampu, A.A., Ersoz, S. & Gunhan, O. (2010). Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 109, 385-91.

Tohashi, K., Nakabayashi, M., Kodani, I., Kidani, K. & Ryoke, K. (2016). Associations between systemic markers of bone turnover or bone mineral density and anti-resorptive agent-related osteonecrosis of the jaw in patients treated with antiresorptive agents. *Yonago Acta Medica*, 59, 45-53.

Torres, S.R., Chen, S.K., Leroux, B.G., Lee, P.P., Hollender, L.G., Santos, E.C.A., Drew, S.P., Hung, K.C. & Schubert, M.M. (2012). Mandibular cortical bone evaluation on cone beam computed tomography images of patients with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Oral and Maxillofacial Radiology*, Vol 113 (5), 695-703.

Treister, N., Friedland, B. & Woo, S. (2010). Use of cone-beam computerized tomography for evaluation of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 109, 753-64.

Vermeer, J., Renders, G., van Duin, M.A., Jansen, I., Bakker, L.F., Kroon, S.A., de 15 Vries, T.J. & Everts, V. (2016). Bone-site-specific responses to zoledronic acid. *Oral Diseases*. 23, 126-133.

Zandi, M., Dehghan, A., Malekzadeh, H., Janbaz, P., Ghadermazi, K. & Amini, P. (2016). Introducing a protocol to create bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rat animal model. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery*, 44, 271-8.

Zecchin, K.G., Jorge, R.S., Jorge, J. (2007). A new method for extraction of mandibular first molars in rats. *Brazilian Journal of Oral Science*, 6 (21), 1344-1348.

TABELAS

Tabela 1 – Definição dos parâmetros microtomográficos utilizados no estudo.

Parâmetros Morfométricos Microtomográficos		
Parâmetro	Unidade	Descrição
BMD	-	Densidade Mineral Óssea (BMD): calibração.
Tb.Th	µm	Espessura Trabecular Óssea (Tb.Th, mm): uma mensuração da largura média da estrutura óssea.
BV/TV	%	Volume de Osso por Fração (BV/TV): uma mensuração da quantidade de osso, representada pela proporção do VOI selecionado que é ocupado por trabéculas.

Tabela 2 – Comparação dos valores médios de todos os parâmetros estruturais ósseos na microCT no lado esquerdo da mandíbula (área afetada) entre o grupo zoledronato e o grupo controle.

Comparação dos valores médios de todos os parâmetros estruturais ósseos na microCT no lado esquerdo da mandíbula (área afetada) entre o grupo zoledronato e o grupo controle												
	Grupo Zoledronato						Grupo Controle					
	T ₀		T ₁		T ₂		T ₀		T ₁		T ₂	
	Média	SD	Mean	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD
BMD	0.373 ^{BA}	0.076	0.485 ^{BA}	0.085	0.813 ^{CA}	0.184	0.324 ^{BA}	0.099	0.417 ^{BA}	0.128	0.705 ^{CA}	0.253
Tb.Th	81.102 ^{BA}	14.507	117.474 ^{BA}	23.349	218.191 ^{CA}	82.526	77.245 ^{BA}	18.223	101.358 ^{BA}	26.567	176.078 ^{BA}	79.575
BV/TV	25.069 ^{BA}	10.461	38.958 ^{BA}	11.089	75.967 ^{CA}	19.336	20.467 ^{BA}	11.564	32.533 ^{BA}	13.723	61.951 ^{CB}	27.330

BMD – Densidade mineral óssea, Tb.Th – Espessura trabecular, BV/TV – Proporção de volume ósseo, T₀ - Avaliação micotomográfica inicial, T₁– Avaliação micotomográfica após administração da droga e anterior a extração dental, T₂ – Avaliação micotomográfica após a extração. SD – Desvio padrão.

^{a,b,c} - Comparação intra-grupos: as médias seguidas da mesma letra minúscula não apresentam diferenças significativas entre os animais do grupo zoledronato nem nos do grupo controle.

^{A,B,C} - Comparação inter-grupos: as médias seguidas da mesma letra maiúscula não apresentam diferenças significativas entre os animais do grupo zoledronato nem nos do grupo controle.

Tabela 3 – Comparação dos valores médios de todos os parâmetros estruturais ósseos na microCT no lado direito da mandíbula (área não afetada) entre o grupo zoledronato e o grupo controle.

Comparação dos valores médios de todos os parâmetros estruturais ósseos na microCT no lado direito da mandíbula (área não afetada) entre o grupo zoledronato e o grupo controle												
	Grupo Zoledronato						Grupo Controle					
	T ₀		T ₁		T ₂		T ₀		T ₁		T ₂	
	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD
BMD	0.403 ^{aA}	0.074	0.546 ^{bA}	0.064	0.603 ^{bA}	0.083	0.332 ^{aA}	0.116	0.440 ^{bA}	0.142	0.492 ^{bA}	0.130
Tb.Th	89.455 ^{aA}	17.341	130.901 ^{bA}	22.850	150.029 ^{bA}	24.513	84.387 ^{aA}	20.169	113.438 ^{aA}	28.131	108.322 ^{aB}	22.953
BV/TV	27.464 ^{aA}	8.693	46.113 ^{bA}	8.561	53.007 ^{bA}	9.552	22.270 ^{aA}	12.492	34.180 ^{aA}	17.516	38.079 ^{bB}	15.244

BMD – Densidade mineral óssea, Tb.Th – Espessura trabecular, BV/TV – Proporção de volume ósseo, T₀ - Avaliação micotomográfica inicial, T₁– Avaliação micotomográfica após administração da droga e anterior a extração dental, T₂ – Avaliação micotomográfica após a extração. SD – Desvio padrão.

a,b,c - Comparação intra-grupos: as médias seguidas da mesma letra minúscula não apresentam diferenças significativas entre os animais do grupo zoledronato nem nos do grupo controle.

A,B,C - Comparação inter-grupos: as médias seguidas da mesma letra maiúscula não apresentam diferenças significativas entre os animais do grupo zoledronato nem nos do grupo controle.

Tabela 4 – Acesso microtomográfico visual.

Características clínicas detectadas em T2					
	Grupo Controle		Grupo Zoledronato		Valor de (p)
	Amostra (n)	Porcentagem (%)	Amostra (n)	Porcentagem (%)	
Cicatrização Normal	13	100%	4	22%	<0,0001*
Exposição óssea	0	0%	14	78%	<0,0001*
Abcessos e fístulas	0	0%	3	18%	0,109*

Tabela 5 – Avaliação da presença de restos radiculares e de lesão periapical na amostra.

Presença de restos radiculares e de lesão periapical				
	Grupo Controle		Grupo Zoledronato	
	Amostra (n)	Porcentagem (%)	Amostra (n)	Porcentagem (%)
Restos radiculares	13	100%	16	94%
Lesão periapical	10	77%	7	41%

Tabela 6 – Comparação das características de diversos estudos que desenvolveram modelos animais.

Comparação entre variados estudos baseados em modelos animais								
Estudo	Amostra	Idade	Protocolo de dosagem do medicamento	Duração da terapia com BF	Intervalo entre as medicações	Via de administração	Trauma induzido	Amostra perdida
Abtahi et al., 2012	40 ratos	10 semanas	Aledronato 200µg/kg/dia	14 dias	1 dose ao dia	Subcutânea	1° Molar superior esquerdo	1 rato
Ali-Erden et al., 2008	80 ratos	5 semanas	Ácido Zoledrônico 7,5µg/kg	21 dias	1, 2 ou 3 doses de 7 em 7 dias	Subcutânea	Molares inferiores e superiores esquerdos	7 ratos
Allen & Burr., 2008	36 beagles fêmeas	1 a 2 anos de idade	Aledronato 0,2mg/kg/dia ou 1,0mg/kg/dia	3 anos	2 doses ao dia	Oral	2° Molar inferior	—
Bi et al., 2010	Camundongos	8 a 12 semanas	Zoledronato 125µg/kg	3 semanas	3 doses por semana	Injeção intraperitoneal	1° Molar superior esquerdo e 1° Molar inferior direito	—
Biasotto et al., 2010	10 ratas Wistar	Animais maduros	Ácido Zoledrônico 0,2mg/ML	5 semanas	1 dose por semana	Intravenosa	1° Molar superior direito e defeito ósseo	—

Hokugo et al., 2010	8 ratos Sprague-Dawley	6 a 8 semanas	Zoledronato 70µg/kg	4 semanas	1 dose a cada 2 semanas	Intravenosa	Molar superior esquerdo	—
Huja et al., 2011	7 cachorros	2 a 3 anos	Zoledronato 0,1mg/kg	4 meses	1 dose por mês	Intravenosa	3° Pré-molar superior e inferior	—
Howie et al., 2011	80 ratas Sprague-Dawley	10 a 12 meses	Zoledronato 80µg/kg ou 0,3 mL	13 semanas	1 vez por semana	Intravenosa	1° Molar superior esquerdo e 2° Molar inferior direito	—
Kobayahi et al., 2010	Camundongos	6 semanas	Zoledronato 250µg/kg/dia	11 dias	1 dose por dia	Intravenosa	1° Molar superior direito	—
Marino et al., 2012	30 ratas Sprague-Dawley	Animais maduros	Zoledronato 20µg/kg	3 semanas	2 doses	Intravenosa	Molares inferiores e superiores	—
Perilli et al., 2010	20 ratas Sprague-Dawley	2 meses	Ácido Zoledrônico 1,6µg/kg	12 semanas	Doses aplicadas nas semanas: 2, 4, 8 e 12	Injeção intraperitoneal	Ovariectomia	3
Senel et al., 2010	60 ratas Sprague-Dawley	10 a 12 semanas	Zoledronato 0,1mg/kg	6 a 8 semanas	Doses aplicadas - semanas: 2, 6 e 8	Injeção intraperitoneal	Sem indução de trauma	—

Zandi et al., 2016	64 ratos Wistar	10 semanas	Zoledronato 0,06mg/kg	4 semanas	1 dose por semana	Injeção intraperitoneal	1° Molar inferior direito e esquerdo	—
Pacheco et al., 2015	42 ratos Wistar	60 dias	Zoledronato 0,02mg/kg	8 semanas	Doses aplicadas semanas: 3 e 8	Injeção intraperitoneal	1° Molar superior esquerdo	1

Gráfico 1 – Comparação dos valores médios e dos intervalos de confiança de todos os parâmetros microtomográficos ósseos quantitativos. A – Densidade mineral óssea (BMD). B – Espessura trabecular (Tb.Th). C – Proporção de volume ósseo (BV/TV). Todos os parâmetros encontraram-se alterados após a administração do zoledronato, ocorrendo anteriormente ao trauma local (T₂).

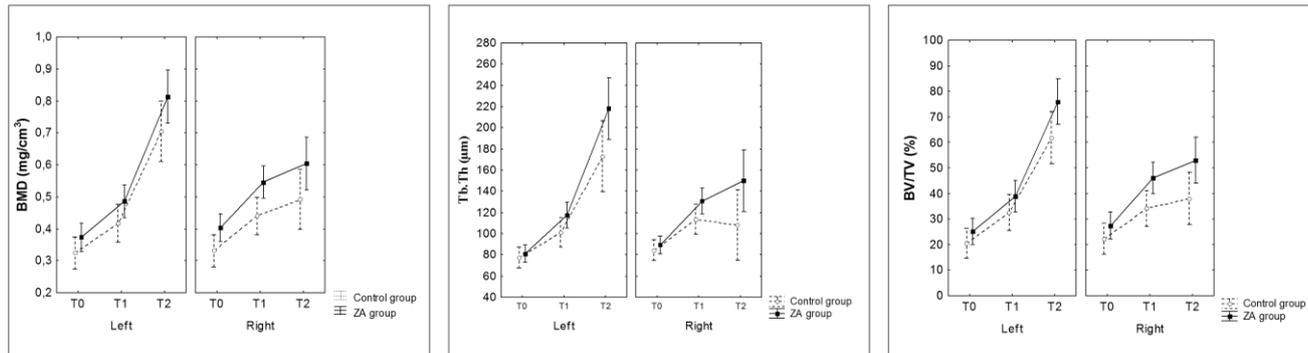


Tabela 7 – Análise qualitativa dos achados microtomográficos visuais, evidenciando os dados referentes ao grupo experimental (ZA) e ao grupo controle.

Achados Microtomográficos visuais				
	Grupo Controle		Grupo Zoledronato	
	Amostra (n)	Porcentagem (%)	Amostra (n)	Porcentagem (%)
Reação periosteal	0	0%	6	35%
Destruição do osso cortical	1	8%	7	41%
Sequestro ósseo na área afetada	0	0%	1	6%

DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



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

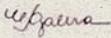
Brasília, 13 de maio de 2016.



DECLARAÇÃO – Prorrogação de Prazo

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





Prof. 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.

NORMAS DA REVISTA

<https://www.elsevier.com/journals/archives-of-oral-biology/0003-9969/guide-for-authors>

ARTICLE STRUCTURE

Manuscript Structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion for an original paper), Acknowledgments, Appendix, References, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

Introduction

This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

Materials and Methods

Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly. Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work.

Authors are requested to make plain that the conditions of animal and human experimentation are as outlined in the "Ethics" and "Studies on Animals" sections above

Results or Findings

These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is unacceptable.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each

affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic, histochemical, etc. A "running title" of not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

Structured abstract

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995; 273: 27-34). In brief, the abstract should be divided into the following sections: (1) Objective; (2) Design - if clinical, to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome

measures, etc.; if laboratory research, to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

As Archives of Oral Biology is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below, should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may be used without definition: ADP, AMP, ATP, DEAE-cellulose, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris.

Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page. Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Bacterial nomenclature

Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not '*Staph. aureus*'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the

intended meaning unclear, the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the *Int J Syst Bacteriol* since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case Roman not italic, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to use italics e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. 'salmonellae'; plurals may be anglicized e.g. 'salmonellas'. For trivial names, use lower case Roman e.g. 'meningococcus'

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Illustration services

Elsevier's WebShop offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author

name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/archives-of-oral-biology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered online or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Reference to a website:

Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003).

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> Accessed 13.03.03.

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T. (2015). Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please

check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Statistical analysis

Authors should ensure that the presentation and statistical testing of data are appropriate and should seek the advice of a statistician if necessary. A number of common errors should be avoided, e.g.: -

- Use of parametric tests when non-parametric tests are required
- Inconsistencies between summary statistics and statistical tests such as giving means and standard deviations for data which were analysed with non-parametric tests.
- Multiple comparisons undertaken with multiple t tests or non-parametric equivalents rather than with analysis of variance (ANOVA) or non-parametric equivalents.
- Post hoc tests being used following an ANOVA which has yielded a non-significant result.

- Incomplete names for tests (e.g. stating "Student's t test" without qualifying it by stating "single sample", "paired" or "independent sample")
- N values being given in a way which obscures how many independent samples there were (e.g. stating simply $n=50$ when 10 samples/measurements were obtained from each of 5 animals/human subjects).
- Stating that $P=0.000$ (a figure which is generated by some computer packages). The correct statement (in this case) is $P<0.0005$.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>