

Larissa Meireles Rodrigues

**ALTERAÇÕES PRECOSES DO OSSO CORTICAL
ASSOCIADAS À OSTEONECROSE POR USO DE
BISFOSFONATOS EM ANIMAIS: UM ESTUDO
LONGITUDINAL**

Brasília
2021

Larissa Meireles Rodrigues

**ALTERAÇÕES PRECOSES DO OSSO CORTICAL
ASSOCIADAS À OSTEONECROSE POR USO DE
BISFOSFONATOS EM ANIMAIS: UM ESTUDO
LONGITUDINAL**

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. Paulo Tadeu de Souza Figueiredo

Co-orientadora: Dra. Nathália Ferrare Pinto

Co-orientador: Prof. Dr. André Ferreira Leite

Brasília
2021

Pelo carinho, afeto e cuidado dos meus pais durante toda a
minha existência, dedico este trabalho a eles.
Com muita gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me guiar aos melhores caminhos e por colocar pessoas especiais em minha vida para que essa missão fosse mais suave.

Aos meus pais, que acreditam no meu potencial e nunca me deixaram desistir dos meus sonhos. Obrigada por todos os valores que me passaram, pelo amor incondicional e por serem a minha base forte. Sem vocês eu não teria chegado até aqui.

À minha irmã, por ser um exemplo de tranquilidade e humildade, por ser a minha conselheira fiel. Obrigada por me ouvir quando mais precisei.

Ao meu noivo, por me apoiar em todas as minhas decisões, sempre com uma palavra de conforto e positividade. Obrigada pela compreensão nos momentos de ausência, pelo companheirismo, por ser refúgio nos momentos de dificuldade e por ser uma fonte de inspiração para mim.

Ao meu orientador Professor Paulo, pelos ensinamentos compartilhados desde o início da graduação, pela orientação e pela calma admirável. Obrigada pelas oportunidades a mim confiadas e pelas palavras amigas quando precisei.

À minha amiga e co-orientadora Nathália Ferrare, por me ensinar o caminho da pesquisa científica com tanta maestria, pelo companheirismo de sempre e por acreditar em mim quando eu menos acreditei. Obrigada por me inspirar como profissional.

Ao meu co-orientador Professor André Leite, por sempre ser prestativo e muito querido. Obrigada pelos ensinamentos.

Aos meus colegas da odontologia, sem os quais a minha graduação não teria sido tão maravilhosa. Obrigada pelos momentos de estudos e de diversão. Levarei vocês para sempre em minhas memórias.

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

RESUMO

RODRIGUES, Larissa. Alterações precoces do osso cortical associadas à osteonecrose por uso de bisfosfonatos em animais: um estudo longitudinal. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

A osteonecrose que acomete o complexo maxilomandibular por uso de medicamentos (MRONJ) é um efeito adverso do uso de medicamentos antirreabsortivos e antiangiogênicos, como os bisfosfonatos (BFs), e a fisiopatologia desta condição ainda é incerta. Objetivo: Avaliar as alterações imaginológicas precoces no osso cortical mandibular em modelo animal de MRONJ. Método: Quarenta ratas foram divididas em dois grupos: zoledronato (Zometa 66 µg/kg) e controle (solução salina). Após três semanas de administração da medicação, as ratas foram submetidas à extração dos primeiros molares inferiores esquerdos, como trauma local. Imagens por microtomografia foram obtidas em três tempos: antes da medicação (T0); após três semanas de medicação (T1) e 6 semanas após a extração dentária (T2). As alterações ósseas corticais foram avaliadas por meio da densidade mineral óssea (DMO) e da dimensão fractal (DF) nos lados afetado (trauma local) e não afetado. Os dados foram avaliados estatisticamente. Resultados: De T0 a T1, a DMO aumentou em ambos os grupos e em ambos os lados, e em T2, os valores médios foram menores no grupo experimental que no grupo controle. Não houve diferenças significativas entre os grupos em relação à DF. Conclusões: A DMO é um possível marcador das alterações precoces relacionadas à osteonecrose.

Palavras-chave: Osteonecrose; Bisfosfonatos; Microtomografia; Modelo Animal

ABSTRACT

RODRIGUES, Larissa. Early cortical bone changes associated with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in animals: A longitudinal study. 2021. Undergraduate Course Final Monograph (Undergraduate Course in Dentistry) – Department of Dentistry, School of Health Sciences, University of Brasília.

Medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) is an adverse effect of the use of antiresorptive and antiangiogenic drugs, such as bisphosphonates (BPs), and the pathophysiology of this condition is still uncertain. Objective: To evaluate early imaging changes in mandibular cortical bone in an animal model of MRONJ. Method: Forty rats were divided into two groups: zoledronate (Zometa 66 µg/kg) and control (saline solution). After three weeks of medication administration, the rats underwent extraction of the lower left first molars, as a local trauma. Microtomography images were obtained at three times: before medication (T0); after three weeks of medication (T1) and 6 weeks after tooth extraction (T2). Cortical bone changes were assessed using bone mineral density (BMD) and fractal dimension (FD) on the affected (local trauma) and non-affected sides. Data were statistically evaluated. Results: From T0 to T1, BMD increased in both groups and on both sides, and at T2, mean values were lower in the experimental group than in the control group. There were no significant differences between groups regarding FD. Conclusions: Mandibular cortical BMD may indicate early alterations related to MRONJ.

Keywords: Osteonecrosis; Disphosphonates; X-Ray Microtomography; Rats

LISTA DE FIGURAS

METODOLOGIA

- Figura 1** Posicionamento dos animais no equipamento SkyScan em decúbito ventral para obtenção das imagens microtomográficas (A), imagem de microCT bidimensional utilizada para conferência do posicionamento do animal no equipamento e definição da região a ser examinada (B).....21
- Figura 2** Volume de interesse (VOI) selecionado na cortical da mandíbula, localizado abaixo da raiz lingual média do primeiro molar inferior.....22

RESULTADOS

- Figura 3** Valores médios da densidade mineral óssea (DMO) comparada entre os grupos (ZA e controle), entre os tempos (T0, T1 e T2) e entre os lados (direito e esquerdo)27
- Figura 4** Valores médios da dimensão fractal (DF) comparada entre os grupos (ZA e controle), entre os tempos (T0, T1 e T2) e entre os lados (direito e esquerdo)28

LISTA DE TABELAS

RESULTADOS

Tabela 1 Comparação dos parâmetros do osso cortical no lado direito (área não afetada) entre o grupo ZA e o grupo controle.....26

Tabela 2 Comparação dos parâmetros do osso cortical no lado esquerdo (área afetada) entre o grupo ZA e o grupo controle.....26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BF/ BFs	Bisfosfonato/ Bisfosfonatos
BRONJ	Osteonecrose por uso de bisfosfonatos
MRONJ	Osteonecrose por uso de medicamentos
ZA	Ácido zoledrônico
TC	Tomografia computadorizada
TCFC	Tomografia computadorizada de feixe cônico
MicroCT	Microtomografia computadorizada
VOI	Volume de interesse
DMO	Densidade mineral óssea
DF	Dimensão fractal
ANOVA	Análise de variância
ICC	Coefficiente de correlação intraclasse
RANK	Fator nuclear Kappa B

SUMÁRIO

Artigo Científico	12
Folha de Título.....	13
Resumo	14
Abstract.....	15
Introdução.....	16
Materiais e Métodos	18
Resultados.....	24
Discussão	29
Conclusão.....	32
Referências Bibliográficas.....	33
Anexo – aprovação ceua-unb – unbdoc nº 5772/2015	40

ARTIGO CIENTÍFICO

FOLHA DE TÍTULO

Alterações precoces do osso cortical associadas à osteonecrose por uso de bisfosfonatos em animais: um estudo longitudinal

Early cortical bone changes associated with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in animals: A longitudinal study

Larissa Meireles Rodrigues^a

Nathália Ferrare Pinto^b

André Ferreira Leite^c

Paulo Tadeu de Souza Figueiredo^d

^a Aluna de Graduação, Departamento de Odontologia, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil

^b Doutora pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Departamento de Odontologia, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil

^c Professor associado, Departamento de Odontologia, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil

^d Professor associado, Departamento de Odontologia, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil

Correspondência: Prof. Dr. Paulo Tadeu de Souza Figueiredo
Campus Universitário Darcy Ribeiro - UnB - Faculdade de Ciências da Saúde - Departamento de Odontologia - 70910-900 - Asa Norte - Brasília – DF. E-mail: paulofigueiredo@unb.br / Telefone: (61) 3107-1803

RESUMO

A osteonecrose que acomete o complexo maxilomandibular por uso de medicamentos (MRONJ) é um efeito adverso do uso de medicamentos antirreabsortivos e antiangiogênicos, como os bisfosfonatos (BFs), e a fisiopatologia desta condição ainda é incerta. Objetivo: Avaliar as alterações imaginológicas precoces no osso cortical mandibular em modelo animal de MRONJ. Método: Quarenta ratas foram divididas em dois grupos: zoledronato (Zometa 66 µg/kg) e controle (solução salina). Após três semanas de administração da medicação, as ratas foram submetidas à extração dos primeiros molares inferiores esquerdos, como trauma local. Imagens por microtomografia foram obtidas em três tempos: antes da medicação (T0); após três semanas de medicação (T1) e 6 semanas após a extração dentária (T2). As alterações ósseas corticais foram avaliadas por meio da densidade mineral óssea (DMO) e da dimensão fractal (DF) nos lados afetado (trauma local) e não afetado. Os dados foram avaliados estatisticamente. Resultados: De T0 a T1, a DMO aumentou em ambos os grupos e em ambos os lados, e em T2, os valores médios foram menores no grupo experimental que no grupo controle. A DF apresentou-se menor, em T2, em relação aos demais tempos, e maior no grupo tratado que no grupo controle. Conclusões: A DMO e a DF óssea mandibular podem indicar alterações precoces relacionadas à osteonecrose.

Palavras-chave: Osteonecrose; Bisfosfonatos; Microtomografia; Modelos Animais

ABSTRACT

Medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) is an adverse effect of the use of antiresorptive and antiangiogenic drugs, such as bisphosphonates (BPs), and the pathophysiology of this condition is still uncertain. Objective: To evaluate early imaging changes in mandibular cortical bone in an animal model of MRONJ. Method: Forty rats were divided into two groups: zoledronate (Zometa 66 µg/kg) and control (saline solution). After three weeks of medication administration, the rats underwent extraction of the lower left first molars, as a local trauma. Microtomography images were obtained at three times: before medication (T0); after three weeks of medication (T1) and 6 weeks after tooth extraction (T2). Cortical bone changes were assessed using bone mineral density (BMD) and fractal dimension (FD) on the affected (local trauma) and non-affected sides. Data were statistically evaluated. Results: From T0 to T1, BMD increased in both groups and on both sides, and at T2, mean values were lower in the experimental group than in the control group. FD was lower at T2 compared to the other times and higher in the treated group than in the control group. Conclusions: BMD and mandibular bone FD may indicate early alterations related to osteonecrosis.

Keywords: Osteonecrosis; Disphosphonates; X-Ray Microtomography; Rats

1. INTRODUÇÃO

Os Bisfosfonatos (BFs) constituem uma classe de medicamentos antirreabsortivos que inibem a remodelação óssea mediada pelos osteoclastos, e têm sido amplamente utilizados para o tratamento de doenças ósseas caracterizadas por perda óssea excessiva, como osteoporose, metástases ósseas, mieloma múltiplo e doença de Paget (Feller et al., 2009; Zara et al., 2015; Manzano-Moreno et al., 2015; Heymann, 2010; Landesberg et al., 2011). No entanto, apesar de ter boa eficácia terapêutica no tratamento dessas doenças, este medicamento apresenta efeitos adversos importantes, sendo a osteonecrose em maxilares o mais relevante.

Este efeito adverso foi descrito pela primeira vez por Marx et al., em 2003, que relataram a alteração óssea em pacientes que receberam ácido zoledrônico por via intravenosa, denominando como osteonecrose em maxilares associada ao uso de bisfosfonatos (BRONJ). Atualmente é denominada como osteonecrose que acomete o complexo maxilomandibular associada ao uso de medicamentos (MRONJ) (Franco et al., 2014; Sentürk et al., 2016; Ruggiero et al., 2014; Zandi et al., 2016; Howie et al., 2015), caracterizada pela presença de exposição óssea ou osso necrótico em maxila ou mandíbula por mais de oito semanas em pacientes sob uso de alguma droga antirreabsortiva ou antiangiogênica, sem histórico de radioterapia em região de cabeça e pescoço, e com ausência de doença metastática nessas regiões (Ruggiero et al., 2014).

A fisiopatologia da MRONJ ainda é incerta, porém deve-se considerar o bloqueio da atividade osteoclástica, a inibição da angiogênese, o microtrauma constante, a supressão da imunidade inata ou adquirida, a deficiência de vitamina D, a toxicidade direta dos tecidos moles e a inflamação como hipóteses relevantes (Ruggiero et al., 2014). A patogênese também pode estar associada a fatores de risco como o tipo de

medicação, o tempo de terapia, o trauma local, os fatores genéticos e a resposta óssea local (Barasch et al., 2011; Rasmusson, Abtahi, 2014, Saad et al., 2012).

Os BFs são divididos em nitrogenados e não nitrogenados, podendo ser administrados por via oral ou intravenosa. Hownie et al. (2015) evidenciaram que os nitrogenados intravenosos são os que possuem maior risco para o desenvolvimento de MRONJ, dentre eles o ácido zoledrônico (ZA), que é considerado o mais potente dos BFs e com efeitos mais prolongados (Tseng et al., 2015).

As características clínicas dessa patologia variam entre os pacientes, podendo ter múltiplos sinais e sintomas, ou ser assintomática (Pasoff et al., 2013). Dor, mobilidade dentária e perda de dentes, formação de abscessos, fístulas intra ou extraorais, edema e eritema são as manifestações clínicas mais comumente encontradas. Apesar de o diagnóstico da osteonecrose basear-se principalmente nos achados clínicos, é possível observar manifestações iniciais da doença, assim como as áreas mais propícias para o surgimento da MRONJ. Algumas ferramentas de imagem podem auxiliar na identificação de alterações precoces dos ossos (Taniguchi et al., 2016).

As análises tomográficas são inespecíficas e podem incluir sequestro ósseo, reação periosteal e fratura dos maxilares, sendo a tomografia computadorizada o método mais sensível de imagem para avaliação de tais alterações (Arce, Assael, Weissman e Markiewicz, 2009; Chiandussi et al., 2006; Treister, Friedland & Woo, 2010).

Dados ósseos mensuráveis foram relatados em indivíduos sob uso de BFs por meio de várias técnicas, incluindo análise da densidade mineral óssea, arquitetura e espessura do osso cortical (Bravenboer et al., 1999; Hylidstrup et al., 2001; Greenspan et al., 2010). Alterações na estrutura cortical do segundo metacarpo foram detectadas na radiografia digital de mulheres em pausa do tratamento com BFs (Bravenboer et al.,

1999). Kubek et al. (2010) relataram a inibição da remodelação óssea intracortical em camundongos sob uso de BFs. Dessa forma, a avaliação por imagem da cortical mandibular pode ser um caminho plausível para detectar alterações ósseas associadas à terapia com essa classe de medicamento.

A microtomografia computadorizada (microCT) consiste no exame de imagem mais sensível para avaliar a morfologia óssea cortical em camundongos e modelos animais pequenos, uma vez que disponibiliza um tamanho de *voxel* isotrópico de até poucos micrômetros, convertendo as informações do valor da escala de cinza nas propriedades do osso (Ramezanzadehkoldeh et al., 2016).

Estudos anteriores já utilizaram BFs de alta dose e extração dentária em modelo animal para identificar sinais clínicos de osteonecrose, porém a fisiopatologia da doença ainda continua incerta (Abtahi, Agholme, Sandberg e Aspenberg, 2012; Ali-Erdem et al., 2011; Allen & Burr, 2008; Bi et al., 2010; Biasotto et al., 2010; Hokugo et al., 2010; Howie et al., 2015; Huja et al., 2011; Kobayashi et al., 2010; Marino et al., 2012; Perilli et al., 2010; Senel et al., 2010; Zandi et al., 2016).

A hipótese deste estudo é que alterações no osso cortical mandibular podem ocorrer precocemente após terapia com medicamentos antirreabsortivos. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as alterações imaginológicas precoces no osso cortical mandibular em modelo animal de MRONJ.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo utilizou a amostra da dissertação de mestrado de Josy Lorena Peres Vilarinho, cujo artigo foi publicado em 2017, intitulado “Early bony changes associated with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rats: A longitudinal in vivo study”.

2.1 Declaração de ética

O estudo teve aprovação da Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília, Brasil (UnBDOC 5772/2015), com apoio financeiro da Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF, Projeto nº 736/2015). Os experimentos foram de acordo com as diretrizes da ARRIVE, assim como o Instituto Nacional da Saúde para cuidado e uso dos laboratórios (NIH) e a Sociedade Brasileira de Ciência Animal de Laboratório (COBEA).

2.2 Modelo animal

A amostra inicial foi composta por quarenta ratas fêmeas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), distribuídas de forma aleatória e alojadas em caixas de propileno, em grupos de quatro, com temperatura média de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$, expostos a ciclos de claro/escuro (12h), com ração e água a livre demanda (*ad libitum*). Após duas semanas de aclimação, as ratas foram divididas aleatoriamente em dois grupos: controle e ácido zoledrônico (ZA). Elas foram anestesiadas e sedadas (cetamina 10%, 90 mg/kg; xilazina 2%, 15 mg/kg) quando necessário para a realização dos experimentos.

2.3 Medicação

Ao grupo ZA, foi administrada uma dose de 66 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Zometa® 4 mg/5 ml (Novartis, Pharma, Basel, Suíça) e, ao grupo controle, um volume semelhante de solução salina, ambos com administração medicamentosa via injeção intraperitoneal. A medicação foi por durante três semanas, três vezes por semana de acordo com Zandi et al. (2016). Os animais foram pesados antes de cada fase experimental para cálculo da dose adequada de medicação e para controle do ganho ou perda de peso durante o estudo. Embasando-se em estudos anteriores (Bi et

al., 2010; Ponte et al., 2016), a idade média dos animais foi de 8 semanas, com peso médio de 250g no momento da administração de zoledronato.

2.4 Extração dentária

Os animais de ambos os grupos tiveram os primeiros molares inferiores esquerdos extraídos três semanas após o início da terapia com bisfosfonatos. Previamente, foram anestesiados com cetamina 10%, 90mg/kg e xilazina 2%, 15mg/kg. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo mesmo operador com auxílio de um explorador dental. Durante 48 h após o procedimento, foi feita analgesia com tramadol (60 mg/kg/dia) duas vezes ao dia. Os animais foram cuidadosamente assistidos após a extração, observando-se o comportamento, a capacidade de alimentação e o processo de cicatrização.

O lado esquerdo, no qual as extrações foram realizadas em ambos os grupos, representou a área com um fator de indução para MRONJ no grupo zoledronato (área supostamente afetada). O lado direito, representado pela área não exposta ao trauma mecânico (sem extração dentária), foi denominado de área não afetada.

2.5 Microtomografia computadorizada (MicroCT)

As varreduras em MicroCT foram realizadas pelo dispositivo SkyScan 1076 (Bruker, Kontich, Bélgica) in vivo, com os seguintes parâmetros técnicos: 18 µm de tamanho do pixel, 100 kV, 100 µA, filtro de Al 1 mm, passo de rotação de 0,44, média da moldura de 5 e 37 minutos do tempo médio de varredura. As reconstruções tridimensionais das imagens foram realizadas, respectivamente, com artefato de anel, suavização e correção de endurecimento ajustada na 14ª posição, a um nível de 55%, com o software NRecon com aceleração GPU, versão 1.6.9, Bruker, Kontich, Bélgica. Para obtenção das imagens, o posicionamento

dos animais foi padronizado em decúbito ventral, com a cabeça apoiada e estabilizada (Figura 1). Durante todo o escaneamento, os animais foram acompanhados cuidadosamente por câmera de vídeo instalada dentro do equipamento de microTC.

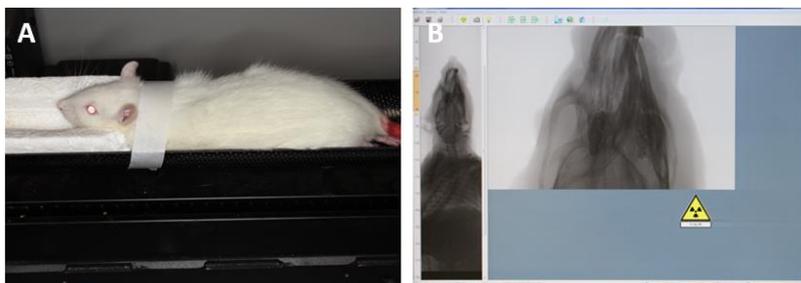


Figura 1 Posicionamento dos animais no equipamento SkyScan em decúbito ventral para obtenção das imagens microtomográficas (A), imagem de microCT bidimensional utilizada para conferência do posicionamento do animal no equipamento e definição da região a ser examinada (B).

O estudo compreendeu três aquisições microtomográficas realizadas em fases distintas:

T0: microCT realizada no primeiro dia experimental, antes da medicação e das extrações dentárias, a fim de se ter um parâmetro basal de análise;

T1: varredura realizada três semanas após a medicação e antes das extrações dentárias para análise das alterações ósseas associadas à administração do ácido zoledrônico;

T2: imagens obtidas seis semanas após as extrações para avaliar se houve alterações ósseas corticais associadas à osteonecrose em maxilares.

Os animais de ambos os grupos foram eutanasiados pela exposição ao gás carbônico após a fase T2.

2.6 Análises microtomográficas

As imagens de microCT foram avaliadas pelos softwares CTAn (versão 1.13, Bruker, Kontich, Bélgica), em uma tela HD de 14 polegadas (Notebook Lenovo Yoga 520, modelo 88YG5000829, Brasília-DF, Brasil), em sala escura e com cegamento para identificação do grupo de animais.

Para análise quantitativa do osso cortical, um volume cilíndrico tridimensional de interesse (VOI) foi definido com um diâmetro de secção 271,6 μm e comprimento de 540 μm , localizado no osso cortical da mandíbula abaixo da raiz lingual média do primeiro molar, seguindo 30 camadas para anterior (Figura 2).



Figura 2 Volume de interesse (VOI) selecionado na cortical da mandíbula, localizado abaixo da raiz lingual média do primeiro molar inferior.

Os parâmetros morfométricos de densidade mineral óssea e dimensão fractal foram analisados dentro do VOI selecionado.

- Densidade mineral óssea: é calculada de acordo com a atenuação do tecido ósseo selecionado, relacionando os valores da microCT (phantom de estado sólido) com um valor mineral equivalente (hidroxiapatita de cálcio) a partir de um fantasma de calibração. O conjunto de dados em escala de cinza foi transformado em unidades de Hounsfield (HU), e os valores de HU correspondentes a duas varreduras fantasmas de hidroxiapatita (0,25 e 0,75 hHA/ cm³) foram utilizados para calibrar escalas de densidade contra unidades de HU.
- Dimensão fractal: a geometria fractal oferece a possibilidade de descrever e caracterizar a complexidade das imagens, assim como sua composição textural, como caracterização das propriedades dos meios porosos, baseada na detecção de padrões na variação de valores na escala de cinza.

Os parâmetros microtomográficos foram analisados em ambos os lados para verificar os efeitos da medicação no osso exposto (esquerdo) e não exposto (direito) ao principal fator de risco para a osteonecrose.

2.7 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Statistica 14.0 (TIBCO software, Palo Alto, Califórnia, Estados Unidos). As análises descritivas foram apresentadas para os parâmetros microtomográficos com base nos grupos avaliados, tempo de avaliação microtomográfica e lado analisado. A análise de variância multifatorial (ANOVA) foi utilizada para comparação dos parâmetros microtomográficos entre os grupos das três diferentes fases do experimento seguida pelo teste LSD-Fisher. Foi realizado o teste t pareado entre os tempos de medição para cada grupo. O coeficiente de correlação

intraclasse (ICC) foi calculado. Um p-valor menor que 0,05 foi considerado como estatisticamente significativo para todos os testes realizados.

3. RESULTADOS

A amostra inicial consistiu de 40 animais. No entanto, quatro animais foram excluídos do estudo devido a artefatos de movimentos nos exames microtomográficos. Dois animais foram excluídos devido à extração acidental do segundo molar durante o procedimento cirúrgico e quatro animais morreram após anestesia ou procedimentos de sedação. Logo, a amostra final foi constituída por 30 animais, sendo 13 do grupo controle e 17 do grupo experimental (zoledronato). Não foram verificadas diferenças nos pesos dos animais entre os dois grupos ao longo do experimento.

3.1 Comparação das alterações corticais da mandíbula no lado direito (não afetado) dos grupos controle e zoledronato

A tabela 1 apresenta a comparação dos dois parâmetros microtomográficos avaliados no lado direito (não afetado), tanto no grupo tratado (zoledronato) quanto no grupo controle. No grupo controle, percebe-se que a densidade da cortical óssea foi significativamente maior em T2 quando comparada a T0. No grupo zoledronato, a densidade foi significativamente maior em T1 quando comparado a T0, porém em T2 observa-se uma diminuição sigificativa deste parâmetro quando comparado aos demais tempos. Ao comparar os dois grupos, verifica-se que, após as extrações (T2), a densidade da cortical óssea foi significativamente maior no grupo controle que no grupo zoledronato (Figura 3).

Em relação à dimensão fractal, não existem diferenças estaticamente significativas nos dois grupos ao longo dos três

tempos e em T2 vemos semelhanças nos valores de dimensão fractal nos grupos tratado e controle (Figura 4).

3.2 Comparação das alterações corticais da mandíbula no lado esquerdo (afetado) dos grupos controle e zoledronato

A tabela 2 apresenta a comparação dos dois parâmetros microtomográficos avaliados no lado esquerdo (afetado), tanto no grupo tratado (zoledronato) quanto no grupo controle. No grupo controle, percebe-se que a densidade mineral óssea cortical foi significativamente maior em T2 quando comparado a T0 e T1. Já no grupo experimental, a densidade foi significativamente maior em T1 quando comparado a T0, porém em T2 observa-se uma diminuição sigificativa deste parâmetro quando comparado a T1. Analisando entre os grupos, em T2, a densidade foi significativamente menor no grupo zoledronato que no grupo controle (Figura 3).

A dimensão fractal apresentou-se estatisticamente menor em T2 em relação a T0 e T1 no grupo controle, mas sem diferença significativa entre os tempos do grupo ZA. Ao comparar os grupos, em T2, não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 4).

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

	Grupo Controle						Grupo Zoledronato					
	T0		T1		T2		T0		T1		T2	
	Média	DP										
DMO	1,190 ^{aA}	0,083	1,255 ^{bA}	0,078	1,364 ^{cA}	0,073	1,258 ^{aB}	0,093	1,316 ^{bB}	0,077	1,244 ^{aB}	0,056
DF	1,821 ^{aA}	0,061	1,799 ^{aA}	0,063	1,799 ^{aA}	0,051	1,811 ^{aA}	0,068	1,819 ^{aA}	0,079	1,805 ^{aA}	0,050

DMO – Densidade mineral óssea, DF – Dimensão fractal, T0 – avaliação microTC inicial, T1 – avaliação microTC após administração de drogas e antes da extração dentária, T2 – avaliação microTC após extração dentária

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

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

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

	Grupo Controle						Grupo Zoledronato					
	T0		T1		T2		T0		T1		T2	
	Média	DP										
DMO	1,160 ^{aA}	0,071	1,194 ^{aA}	0,084	1,357 ^{bA}	0,052	1,203 ^{aA}	0,064	1,293 ^{bB}	0,067	1,252 ^{bB}	0,064
DF	1,814 ^{aA}	0,056	1,817 ^{aA}	0,062	1,788 ^{bA}	0,062	1,827 ^{aA}	0,055	1,820 ^{aA}	0,068	1,807 ^{aA}	0,040

DMO – Densidade mineral óssea, DF – Dimensão fractal, T0 – avaliação microTC inicial, T1 – avaliação microTC após administração de drogas e antes da extração dentária, T2 – avaliação microTC após extração dentária

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

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

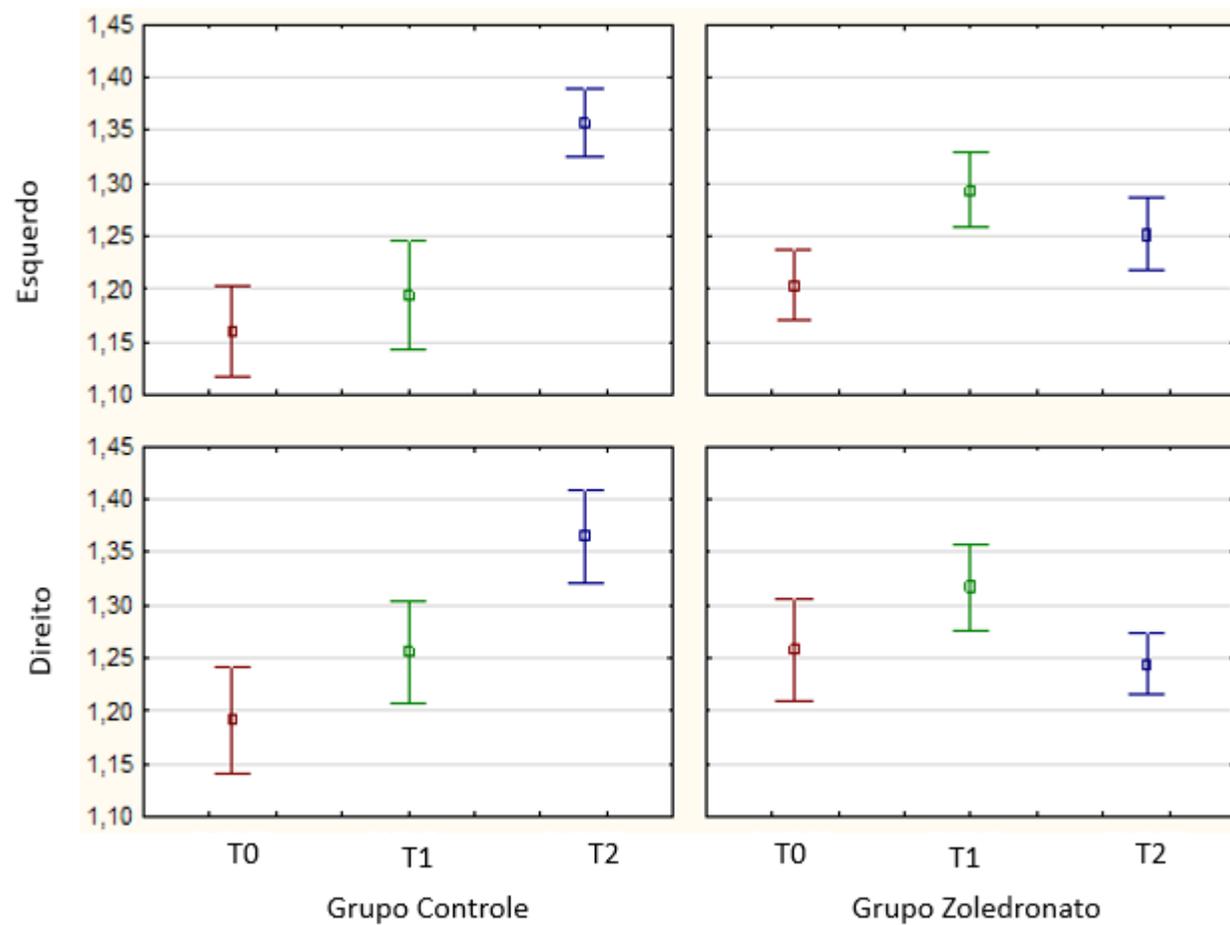


Figura 3 Valores médios da densidade mineral óssea (DMO) comparada entre os grupos (ZA e controle), entre os tempos (T0, T1 e T2) e entre os lados (direito e esquerdo).

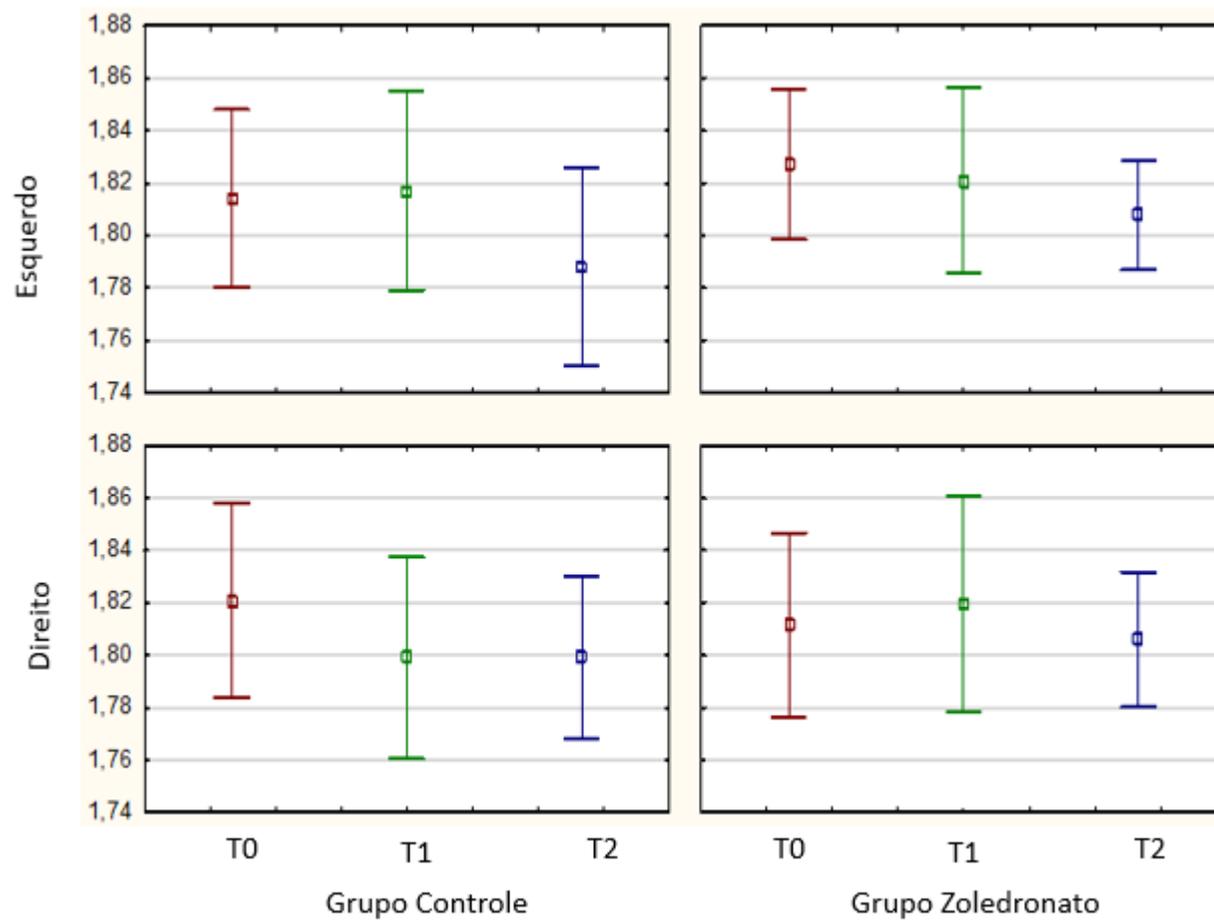


Figura 4 Valores médios da dimensão fractal (DF) comparada entre os grupos (ZA e controle), entre os tempos (T0, T1 e T2) e entre os lados (direito e esquerdo).

4. DISCUSSÃO

Nosso estudo foi o primeiro a avaliar, longitudinalmente em modelo animal, as alterações ósseas corticais microtomográficas que podem predizer a MRONJ. Muitos estudos avaliaram a ocorrência de osteonecrose em regiões que sofreram trauma, evidenciando que a cortical mandibular de pacientes sob uso de bisfosfonatos apresentem modificações precoces que sugeriram a propensão ao desenvolvimento da doença, porém são inconclusivos sobre os mecanismos por trás deste efeito.

A MRONJ foi induzida com administração de ácido zoledrônico e, posteriormente, extração dentária, consistindo em um método bem relatado na literatura. O zoledronato tem a maior afinidade de ligação mineral dentre as classes de bisfosfonatos, indicando alta potência e longa duração de ação (Murphy et al., 2014), sendo a classe de escolha para o estudo.

As alterações ósseas foram avaliadas por meio da microtomografia computadorizada (microCT), exame de imagem mais sensível frente à morfologia óssea cortical em modelos animais (Ramezanzadehkoldeh et al., 2016). Vários autores declararam que a microCT pode ser considerada como o método padrão-ouro para analisar a microestrutura óssea (Bouxsein et al., 2010; Junquera et al., 2014). As mudanças ósseas foram avaliadas tanto na região em que houve o trauma, quanto no lado contralateral sem extração. Além disso, as análises microtomográficas quantitativas do grupo ZA foram comparadas com o grupo controle, que não recebeu a medicação e também sofreu o procedimento cirúrgico.

A densidade mineral óssea (DMO) é indicada como um importante marcador para o risco de desenvolver MRONJ em pacientes sob terapia com BFs (Tohashi et al., 2016). Ao avaliar este parâmetro microtomográfico, nosso estudo detectou que, no grupo experimental, a DMO aumentou de T0 para T1, mas sem

diferença estatisticamente significativa. Ao comparar de T1 para T2, no grupo ZA, a DMO diminuiu significativamente em ambos os lados mandibulares (afetado e não afetado pelo trauma), ao passo que no grupo controle esse parâmetro aumentou. De acordo com a literatura, seria de se esperar que a densidade cortical indicasse um aumento progressivo no decorrer das tomadas microtomográficas, tanto pela ação do medicamento antirreabsortivo, quanto pelo aumento da massa com a idade. Essa hipótese não foi corroborada por nosso estudo, que demonstrou a diminuição significativa desse parâmetro microtomográfico no grupo experimental no último tempo de avaliação.

Deve-se enfatizar que a DMO é um parâmetro ósseo influenciado por vários fatores, como idade do animal, metabolismo ósseo e tempo de interrupção da medicação (Matsumoto et al., 2017; Kim et al., 2019; Allen et al., 2010). Embora o pico da massa óssea dos animais estudados possa ter influenciado os nossos resultados de DMO, conferindo uma limitação ao estudo, ratos mais velhos não poderiam apoiar o protocolo envolvendo etapas múltiplas e procedimentos invasivos. Seria preferível se pudéssemos realizar mais exames de microCT para verificar a hora exata em que ocorrem mudanças ósseas. No entanto, isso não é possível na prática clínica, e uma maior dose de radiação pode interferir no processo patológico de osteonecrose. Outros estudos de imagem longitudinal ajudariam a esclarecer o início das mudanças ósseas associadas à doença.

Embora os alvos terapêuticos dos BFs sejam principalmente osteoclastos, evidências sugerem efeitos desses medicamentos em outros tipos de células, o que pode fornecer pistas importantes sobre a patogênese da MRONJ. Kim et al. evidenciaram que a presença de zoledronato nos osteócitos murinos MLO-Y4 induz a sobreexpressão de esclerotina, um antagonista de Wnt que inibe a atividade dos osteoblastos, e

também o aumento da expressão de RANKL, citocina essencial para a osteoclastogênese. Esses achados sugerem que a terapia com BFs resulte em uma redução da formação e da massa óssea, culminando em uma provável redução na densidade mineral óssea. Estudos histopatológicos que analisem os impactos do zoledronato no metabolismo de diversos tipos de células ósseas e correlacione com a análise microtomográfica da DMO são necessários.

Além das hipóteses acima citadas, há também os efeitos celulares dependentes do tempo de suspensão da medicação. O osso cortical leva mais tempo para experimentar tanto a supressão da remodelação óssea após o início do tratamento, quanto a recuperação do processo após a suspensão do antirreabsortivo quando comparado ao osso trabecular (Allen et al., 2010). Evidências apontam que a descontinuação da terapia com BFs resulta na recuperação do turnover, embora os valores dependam de qual medicamento foi ministrado, da dose e da duração do tratamento (Yoshida et al., 1998; Black et al., 2006; Grey et al., 2009). Grey et al. evidenciaram que, após dose única de zoledronato intravenoso, os biomarcadores de remodelação foram significativamente suprimidos em comparação à linha de base por pelo menos três anos. Neste presente estudo, foi administrado uma dose de 66 µg/kg de Zometa® durante três semanas, três vezes por semana, sendo que a última tomada microtomográfica (T2) ocorreu nove semanas após a medicação. Dessa forma, vale ressaltar que, de acordo com a literatura, podem ter ocorrido mudanças ósseas referentes ao tempo de suspensão da medicação.

A dimensão fractal (DF) descreve uma razão de complexidade, categorizando a microestrutura de meios porosos, particularmente o tecido ósseo. Molina et al. (2012) evidenciaram que é possível avaliar a microarquitetura porosa do osso cortical por meio de imagens de microCT, auxiliando no diagnóstico de alterações ósseas. Apesar de alguns estudos já terem mostrado

a relevância da DF para o diagnóstico de alterações ósseas, esse parâmetro não demonstrou diferenças significativas no osso cortical da mandíbula frente à presença de terapia com bisfosfonatos no presente estudo.

Após o procedimento cirúrgico (T2), além dos parâmetros quantitativos já detectados, observou-se os achados clínicos e microtomográficos qualitativos da MRONJ. Apenas animais do grupo ZA apresentaram exposição óssea, abscessos, destruição do córtex mandibular, sequestro ósseo e reação periosteal óssea, consistindo em sinais clínicos e de imagem de MRONJ reconhecidos em pacientes (Ruggiero et al., 2014). Em relação aos achados microtomográficos, deve-se enfatizar a alta frequência de reação periosteal no grupo zolendronato, que provavelmente é determinada pela intensidade, agressividade e duração do processo inflamatório relacionado ao MRONJ. A disseminação subperióstica de tal inflamação estimula a nova formação óssea que circunda o córtex mandibular (Rana, Wu e Eisenberg, 2009).

Além da limitação apresentada anteriormente referente à idade dos animais, o presente estudo também apresentou limitações frente ao protocolo experimental de terapia com bisfosfonatos, tanto em relação à dose administrada, quanto à duração da terapia. Estudos imaginológicos futuros que nos auxiliem a esclarecer o momento exato das alterações ósseas associadas a MRONJ, correlacionadas ao tempo de suspensão da medicação, são necessários.

5. CONCLUSÃO

Este estudo longitudinal in vivo evidenciou que as alterações imaginológicas ocorrem precocemente na cortical do osso mandibular em modelo animal de osteonecrose por uso de bisfosfonatos. A densidade mineral óssea é um possível marcador das alterações precoces relacionadas à osteonecrose.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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.

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., Ehrchiou, D., Cao, C., Kikuri, 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.

Bouxsein, M., Boyd, S., Christiansen, B., Guldberg, R., Jepsen, K., Müller, R. (2010). Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*, 25, 1468-86.

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.

de Molon, R., Shimamoto, H., Bezouglaia, O., Pirih, F., Dry, S., Kostenuik, P., Boyce, R., Dwyer, D., Aghaloo, T., Tetradis, S. (2015). OPG-Fc but Not Zoledronic Acid Discontinuation Reverses Osteonecrosis of the Jaws (ONJ) in Mice. *J Bone Miner Res*, 30,1627-40.

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.

Hamada, H., Matsuo, A., Koizumi, T., Satomi, T., Chikazu, D. (2014). A simple evaluation method for early detection of bisphosphonate-related osteonecrosis of the mandible using computed tomography. *J Craniomaxillofac Surg*, 42, 924-9.

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. (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.

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.

Lee, J., Kim, H., Yun, J. (2017). Three-dimensional microstructure of human alveolar trabecular bone: a micro-computed tomography study. *J Periodontal Implant Sci*, 47, 20-29.

Liu, J., Liu, S., Zhao, Y., Gu, X., Li, Q., Jin, Z., Chen, Y. (2016). Effects of occlusion on mandibular morphology and architecture in rats. *J Surg Res*, 200, 533-43.

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.

Matsumoto, M., de Abreu Furquim, E., Gonçalves, A., Santiago-Júnior, J., Saraiva, P., Cardoso, C., Munerato, M., Okamoto, R. (2017). Aged rats under zoledronic acid therapy and oral surgery. *J Craniomaxillofac Surg*, doi: 10.1016/j.jcms.2017.02.002. [Epub ahead of print]

Mücke, T., Krestan, C., Mitchell, D., Kirschke, J., Wutzl, A. (2016). Bisphosphonate and Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: A Review. *Semin Musculoskelet Radiol*, 20, 305-14.

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.

Rana, R., Wu, J., Eisenberg, R. (2009). Periosteal Reaction. *AJR Am J Roentgenol*, 193, W259-72.

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.

Takaishi, Y., Ikeo, T., Nakajima, M., Miki, T., Fujita, T. (2010). A pilot case-control study on the alveolar bone density measurement in risk assessment for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Osteoporos Int*, 21, 815-25.

Taniguchi, T., Arijji, Y., Nozawa, M., Naitoh, M., Kuroiwa, Y., Kurita, K., Arijji, E. (2016). Computed tomographic assessment of early changes of the mandible in bisphosphonate-treated patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 122, 362-72.

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.

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 Vries, T.J. & Everts, V. (2016). Bone-site-specific responses to zoledronic acid. *Oral Diseases*. 23, 126-133.

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

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

ANEXO – APROVAÇÃO CEUA-UNB – UNBDOC Nº 5772/2015



Universidade de Brasília

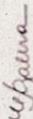
 Instituto de Ciências Biológicas

 Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 13 de maio de 2016.

DECLARAÇÃO – Prorrogação de Prazo

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


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





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