

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA INTEGRADA

Leomar Emanuel Almeida Mecca

**Avaliação do Ranelato de Estrôncio na indução ou proteção de
osteonecrose. Estudo em ratas ovariectomizadas**

PONTA GROSSA

2018

Leomar Emanuel Almeida Mecca

Avaliação do Ranelato de Estrôncio na indução ou proteção de osteonecrose. Estudo em ratas ovariectomizadas

Dissertação apresentada como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no curso de Mestrado em Odontologia – Área de Concentração: Clínica Integrada – Linha de Pesquisa: Etiologia, diagnóstico e tratamento das doenças bucais.

Orientador: Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco.

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Bauml Campagnoli.

PONTA GROSSA

2018

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Mecca, Leomar Emanuel Almeida
L576 Avaliação do Ranelato de Estrôncio na
 indução ou proteção de osteonecrose.
 estudo em ratas ovariectomizadas/ Leomar
 Emanuel Almeida Mecca. Ponta Grossa, 2018.
 66f.

 Dissertação (Mestrado em Odontologia -
 Área de Concentração: Clínica Integrada),
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.

 Orientador: Prof. Dr. Gilson Cesar
 Nobre Franco.

 Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Bauml
 Campagnoli.

 1.Bifosfonatos. 2.Osteonecrose.
 3.Cirurgia bucal. I.Franco, Gilson Cesar
 Nobre. II. Campagnoli, Eduardo Bauml.
 III. Universidade Estadual de Ponta
 Grossa. Mestrado em Odontologia. IV. T.

CDD: 617.606

LEOMAR EMANUEL ALMEIDA MECCA

Avaliação do ranelato de estrôncio na indução ou proteção de osteonecrose. Estudo em ratas ovariectomizadas.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto sensu em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Clínica Integrada, linha de pesquisa de Etiologia, Diagnóstico e Tratamento das doenças bucais.

Ponta Grossa, 22 de fevereiro de 2018.



Prof^a. Dr^a. Joice Naiara Bertaglia Pereira
Universidade de São Paulo



Prof^a. Dr^a. Márcia Thaís Pochapski
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Gilson César Nobre Franco
Universidade Estadual de Ponta Grossa

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço primeiramente a **Deus**, que em sua infinita bondade me capacitou a realizar este sonho, me confortando e dando forças todos os dias e em todos os momentos.

Aos meus pais, **Rudimar e Elieuzá**, por acreditarem em mim desde o meu nascimento, mesmo quando o dinheiro parecia faltar, o amor e a fé e Deus nunca faltaram. Amo vocês infinitamente.

Aos meus avós **Leomar e Nena**, base da minha criação, meu porto seguro, toda a minha essência. Obrigado por estarem sempre ao meu lado mesmo quando a distância insistia em nos separar. Meu coração será de vocês eternamente.

À minha tia **Sandra** por ser fonte de inspiração quando o assunto é docência, afinal você sempre foi e sempre será a primeira professora da minha vida. Obrigado por sempre me incentivar.

À toda a minha família, por sempre me fazer sentir a pessoa mais amada desse mundo.

À minha amada esposa **Aureliane**, que sonhou este sonho junto comigo, teve muita paciência, e me doou sua força quando eu achava que já não era capaz. Que sempre insistiu que eu continuasse, e que aceitou se casar comigo, mesmo quando havia um mestrado e pouco dinheiro entre nós.

Minhas vitórias e meu amor sempre serão seus.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. **Gilson Cesar Nobre Franco**, pela honra de dividir seus conhecimentos comigo, por confiar em mim quando eu já não confiava, por me proporcionar momentos de descontração e principalmente por ser tornar um amigo ao longo desses dois anos. Espero estar junto com você nas próximas etapas.

Aos professores Drs. **Fabio André Santos e Márcia Thaís Pochapski**, por ouvirem meus desabaços, me ajudarem a enxergar o mundo com outros olhos, e criarem um ambiente tão família no laboratório M-13.

Ao professor Dr. **Eduardo Bauml Campagnoli**, por me conceder a oportunidade de acompanhar as clínicas de estomatologia, por me ajudar nas análises histológicas e por me conceder a honra de me coorientar.

A professora Dra. **Marcela Claudino**, por sempre estar pronta para me ajudar nos momentos em que eu mais me desesperai, e me mostrar que no fim as coisas sempre dão certo.

Aos colegas de laboratório **Ana Claudia, Daniella, Gustavo, Luisa Mariane e Evelyn**, obrigado por lerem meus textos, rirem das minhas piadas e me ajudarem tanto no laboratório quando nos experimentos, fotografias e lavagem de materiais, quando necessário.

As minhas queridas coorientadas de iniciação científica **Jessica, Gabrielle e Tayline**. Sem vocês eu jamais poderia estar escrevendo nada disso. Obrigado por me permitirem ser um pouquinho professor de vocês.

As meninas do biotério da UEPG, **Marlene, Mari e Jo**, por estarem com as minhas ratinhas sempre que eu não podia estar presente.

Aos meus amigos de infância do grupo “**PPG**” por nunca me abandonarem mesmo que eu passe meses sem ir para Monte Castelo.

A minha grande amiga Dra. **Joice Naiara Bertaglia Pereira**, por ser desde o ensino médio fonte de inspiração e saber, quero sempre você em minha vida “Obrigado por existir”.

As minhas amigas Doutoradas **Rafaela, Amanda, Stefanie e Raissa**, por se manterem em minha vida mesmo com a correria do dia a dia.

A todos os participantes da equipe **Sharkleaders** por me proporcionarem momentos divertidos e de descontração, e por me aceitarem como membro parte da equipe.

A equipe da clínica odontológica **Odontocenter**, que mesmo eu me ausentando por conta do mestrado sempre me incluíram em tudo.

Aos colegas de mestrado que ingressaram nessa jornada comigo.

À CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, onde obtive formação técnica e científica de qualidade.

E à todas as pessoas que contribuíram para o meu crescimento como pessoa. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

Muito obrigado, vocês foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

**“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém[...]
Confie em si mesmo
Quem acredita sempre alcança!”**

Renato Russo (Mais Uma Vez)

Resumo

MECCA, L.E.A. **Avaliação do Ranelato de estrôncio na indução ou proteção de osteonecrose. Estudo em ratas ovariectomizadas** [Dissertação Mestrado em Clínica integrada]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2018.

O objetivo deste trabalho foi avaliar se o fármaco ranelato de estrôncio causa quadros de osteonecrose sobre o tecido ósseo de ratas ovariectomizadas, tratadas ou não com bifosfonatos. Para a realização da pesquisa, 40 ratas foram ovariectomizadas e divididas em 4 grupos: C (recebendo solução salina), BF (1 aplicação semanal de ácido zoledrônico IP 0,4 mg / kg), RE (625mg/Kg/dia de ranelato de estrôncio via gavagem) e BF+RE (associação de bifosfonato e ranelato de estrôncio nas concentrações indicadas acima). Foram realizadas exodontias dos primeiros molares inferiores. Após o término do tempo experimental, os animais foram eutanasiados, e seguiram para as seguintes análises: radiográfica e histológica. Os resultados apontam que o grupo RE macroscopicamente obteve uma cicatrização gradual assim como o grupo C. Já o grupo BF apresentou áreas de fenestração óssea e deiscência. Quando comparado radiograficamente por densidade de pixel, os grupos experimentais obtiveram diferença estatística ($p < 0,05$) com o C mas não entre si. Com relação a análise histológica, os resultados apontaram que o ranelato de estrôncio não causa osteonecrose, este possui uma tendência ao aumento o número de osteócitos, vasos sanguíneos e reduz a quantidade de osteoclastos. Já o bifosfonato causa osteonecrose, reduz o número de vasos sanguíneos e osteócitos, porém aumentou o número de osteoclastos. O grupo BF+RE, apesar da redução dos quadros de necrose, não foi eficaz na forma profilática para osteonecrose. Assim, pode-se concluir que o Ranelato não causa quadros de osteonecrose, mas também não pode ser utilizado como agente profilático para a doença.

Palavras Chave: Bifosfonatos, Osteonecrose, Cirurgia Bucal

ABSTRACT

MECCA, L.E.A. **Evaluation of Strontium Ranelate in the induction or protection of osteonecrosis. Study in ovariectomized rats** [Dissertação Mestrado em Clínica integrada]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2018.

The aim of this study was to evaluate whether the drug strontium ranelate causes osteonecrosis on the bone tissue of ovariectomized rats, treated or not with bisphosphonates. To perform the research 40 rats were ovariectomized and divided into 4 groups: C (receiving saline solution), BF (1 weekly application of zoledronic acid IP 0.4 mg / kg), RE (625 mg / kg / day strontium ranelate via gavage) and BF+RE (association of bisphosphonate and strontium ranelate at the concentrations indicated above). Exodontia of the lower first molars was performed. After the end of the experimental time, the animals were sacrificed, followed by the following radiographic, microtomographic and histological analyzes. The results indicate that the RE group macroscopically obtained a gradual cicatrization as well as the group C. The BF group presented areas of bone fenestration and dehiscence. When compared radiographically by pixel density, the experimental groups obtained statistical difference with C but not with each other. Regarding the histological analysis, the results pointed out that strontium ranelate does not cause osteonecrosis, this has a tendency to increase the number of osteocytes, blood vessels and reduces the amount of osteoclasts. However, bisphosphonate causes osteonecrosis, reduces the number of blood vessels and osteocytes, but increased the number of osteoclasts. The BF+RE group, despite the reduction of necrosis pictures, was not effective prophylactically for osteonecrosis. Thus, it can be concluded that Ranelate does not cause osteonecrosis, nor can it be used as a prophylactic agent for the disease.

Keywords: Bisphosphonates, Osteonecrosis, Surgery Oral

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Aspecto intra-oral de caso de ONMB na maxila, com presença de osso necrótico exposto, colapso do tecido mole e drenagem purulenta ativa. Fonte: ALMASAN et al. 2011.	26
FIGURA 2- Aspecto imaginológico (tomografia computadorizada de feixe cônico, corte axial) da ONMB. As flechas indicam áreas de fenestração óssea e sequestros ósseos. Imagem de RUGGIERO; FANTASIA; CARLSON, 2006.....	28
FIGURA 3 - Radiografia panorâmica mostra defeito ósseo extenso do lado esquerdo (deiscência) após perda dos implantes. A seta indica área de sequestro ósseo, considerada uma das características das ONM Fonte: LAZAROVICI et al. 2009.....	28
FIGURA 4 - Apresenta as características histológicas da ON, corada com hematoxilina e eosina. A: colônias de bactérias associadas ao tecido necrótico; B: Poucos osteócitos presentes; C: Lacunas vazias adjuntas. (Fonte o autor).....	29
FIGURA 5- Passos da ovariectomia. 1-Tricotomia bilateral; 2: Teste de sensibilidade; 3: Exposição do músculo; 4: Pinçamento em bloco e acesso a cavidade intraperitoneal; 5: Gordura periovariana e exposição do ovário em formato de ‘amora’; 6: Ovário ‘laçado’; 7: Remoção do ovário com bisturi; 8: Sutura no plano muscular; 9: Sutura na pele dos animais.	36
FIGURA 6 - Delineamento experimental.	36
FIGURA 7 - Cálculo da quantidade de RE segundo Reagan-shaw, Nihal e Ahmad (2007).	37
FIGURA 8- Sequência de exodontia, A: Dente hígido; B: Posicionamento da sonda entre a distal do primeiro molar e a mesial do segundo molar; C luxação do primeiro molar; D:Posicionamento da sonda entre as raízes para evitar fraturas; E: Alvéolo sem a presença do dente; F: Dente fora do alvéolo.	38
FIGURA 9 - Avaliação macroscópica da hemimandíbula esquerda. O círculo mostra a região avaliada durante a macroscopia. A seta aponta trajeto fistular, causando uma fenestração, encontrados nos grupos BF e BF+RE.	39
FIGURA 10 - Radiografias da hemimandíbula esquerda, com a presença de raiz residual (RR), sequestros ósseos (SO) e cicatrização gradual (cG).	40
FIGURA 11 - Ferramenta de calibração do programa ImageJ	41
FIGURA 12 - Mensuração da área alveolar, para obtenção da escala de cinza.	41

FIGURA 13 –Os círculos representam as regiões fotografadas em maior aumento das lâminas coradas com hematoxilina e eosina.	42
FIGURA 14 - Contagem de osteócitos na lâminas coradas com hematoxilina e eosina.	43
FIGURA 15 - Contagem de lacunas vazias nas lâminas coradas com hematoxilina e eosina.	43
FIGURA 16 - Contagem de vasos sanguíneos nas lâminas coradas com hematoxilina e eosina.	44
FIGURA 17 - Contagem de osteoclastos nas lâminas coradas com hematoxilina e eosina. As setas indicam os osteoclastos presentes na imagem.	44
FIGURA 18 - Área de necrose óssea nas lâminas coradas com hematoxilina e eosina.	45
FIGURA 19 - Representação gráfica das médias da área de reparo ósseo alveolar expressa em escala de cinza (pixel), excluindo raízes residuais e sequestros ósseos. Os resultados estão expressos como média e erro padrão da média (EP) dos valores da escala de cinza (n=10). A ≠ B indica diferença estatística entre os grupos (ANOVA, Tukey $p < 0,05$).	48
FIGURA 20 - Avaliação da % de lacunas vazias presentes no osso alveolar, excluindo sequestros ósseos. Os resultados estão expressos como média e erro padrão da média (EP) A ≠ B ≠ C indicam diferenças estatísticas entre os grupos (Kruskal-Wallis, Dunn's $p < 0,05$).	49
FIGURA 21 - Razão entre o número de osteócitos e a área óssea total, excluindo sequestros ósseos. (n= 10). Os resultados estão expressos com média e erro padrão da média (EP) A ≠ B ≠ C indicam diferenças estatísticas entre os grupos (Kruskal-Wallis, Dunn's $p < 0,05$).	49
Figura 22 Comparação histológica entre os grupos, observando lacunas vazias e quantidade de osteócitos.	50
FIGURA 23 - Razão entre o número de vasos sanguíneos e a área óssea. Os resultados estão expressos com média e erro padrão da média (EP) dos vasos sanguíneos por mm^2 (n=10). A ≠ B ≠ C indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA, Tukey $p < 0,05$).	51
FIGURA 24- Cortes histológicos evidenciando por setas a presença de vasos sanguíneos.	51
FIGURA 25 - Média do número de osteoclastos presentes nos cortes histológicos. Os resultados estão expressos com média e erro padrão da média (EP). (n =10). A ≠ B ≠ C indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA, Tukey $p < 0,05$).	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de BF disponíveis, nome comercial, via de administração, estrutura das cadeias R1 e R2 e potências relativas em comparação ao etidronato.....	18
Tabela 2 - Classificação dos estágios clínicos da ONMB.....	24
TABELA 3 -Possíveis achados imaginológicos em ONMB	25
TABELA 4 - Estratégias de tratamento para os diferentes estágios de ONMB	30
TABELA 5 - Análise macroscópica das hemimandíbulas esquerda após dissecação, desidratação.....	45
TABELA 6 - Análise qualitativa das imagens radiográfica digitais	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAOMS	Association of Oral and Maxillofacial Surgeons
ANOVA	Análise da variância
ATP	Adenosina trifosfato
AZ	Ácido zoledrônico
BFs	Bifosfonatos
C	Carbono
CG	Remodelação óssea e cicatrização gradual
CID	Classificação Internacional de Doenças
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação animal
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMA	Committee at the European Medicines Agency
IP	Intraperitoneal
IV	Intravenoso
N	Nitrogênio
N-BF	Bifosfonatos nitrogenados
ONM	Osteonecrose dos maxilares
<i>ONMB</i>	Osteonecrose dos maxilares causada por bifosfonatos
OPG	Osteoprotegerina
OVX	Ovariectomia
P	Fósforo
RE	Ranelato de estrôncio
RR	Raízes residuais
S-BF	Bifosfonatos simples
SO	Sequestros ósseos
Sr	Estrôncio
Sr ²⁺	Íons estrôncio

UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VO	Via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Bifosfonato	19
2.1.1. FARMACOCINÉTICA.....	20
2.1.2 MECANISMO DE AÇÃO	20
2.1.3 INDICAÇÕES.....	22
2.1.4 EFEITOS ADVERSOS	22
2.2 RANELATO DE ESTRÔNCIO	22
2.2.1 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS.....	23
2.2.2 MECANISMO DE AÇÃO	24
2.2.3 EFEITOS ADVERSOS	24
2.3 OSTEONECROSE DOS MAXILARES ASSOCIADA AO USO DOS BFS (ONMB)	25
2.3.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA OSTEONECROSE DOS MAXILARES.....	25
2.2.2 CARACTERÍSTICAS RADIOGRÁFICAS	26
2.2.3 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS.....	28
2.2.4 FATORES DE RISCO	29
2.2.5 TERAPÊUTICA	30
3. OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1 ANIMAIS E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	34
4.2 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO AMOSTRAL	34
4.3 INDUÇÃO DA OSTEOPENIA ATRAVÉS DE OVARECTOMIA (OVX).....	35
4.4 DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	36
4.5 GAVAGEM DE SOLUÇÃO SALINA E RANELATO DE ESTRÔNCIO.....	37
4.6 APLICAÇÃO DE ÁCIDO ZOLEDRÔNICO (AZ) I.P.	37
4.7 EXODONTIAS	37
4.8 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	38
4.9 ANÁLISE MACROSCÓPICA	39
4.10 ANÁLISE RADIOGRÁFICA	39
4.11 ANÁLISE HISTOLÓGICA	41
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45

5. RESULTADOS	46
5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA	46
5.2 ANÁLISE RADIOGRÁFICA QUALITATIVA.....	46
5.3 ANÁLISE DE DENSIDADE POR PIXEL.....	47
5.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA	48
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÃO.....	57
8. REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

As drogas antirreabsortivas são aquelas que atuam diretamente na homeostase óssea, reduzindo ou suprimindo sua reabsorção e consequentemente sua renovação, tem como células alvo os osteoclastos. Estes fármacos são administrados no manejo de distúrbios ósseos como: osteoporose, osteopenia, câncer, metástases ósseas, hipercalemia maligna e outras condições de doença em que a reabsorção óssea osteoclástica elevada desempenha um papel patogênico (YAMASHITA; MCCAULEY, 2012).

As principais drogas desta classe atualmente são os bifosfonatos (BFs). Análogos sintéticos químicos do ácido pirofosfórico, uma substância endógena considerada um inibidor natural da reabsorção óssea, são utilizados no tratamento de enfermidades ósseas de cunho maligno ou não (KHOSLA et al., 2007). Este fármaco atua sobre os osteoclastos de diversas formas, mas principalmente, através da inibição do recrutamento, redução do tempo de vida, e veto das atividades da célula na superfície óssea. Além de interferir em processos metabólicos essenciais para a manutenção da célula, contribui para a apoptose (BARON; FERRARI; RUSSELL, 2011). Apesar de seus pontos benéficos no tratamento de distúrbios ósseos, os BFs apresentam como efeito adverso, ulceração do assoalho de boca e a osteonecrose dos maxilares (ONM) (BENLIDAYI; GUZEL, 2013).

Embora os eventos adversos relacionados à terapia antirreabsortiva sejam geralmente considerados infrequentes e leves, a ONM está agora estabelecida como clinicamente significativa, potencialmente condição dolorosa e debilitante que pode afetar significativamente a qualidade de vida dos pacientes. Esta é uma condição patológica do tecido ósseo e está associada à destruição de seu componente medular hematopoiético e osteócitos. Clinicamente a ONM apresenta-se com áreas de fenestração óssea expostas à cavidade bucal e/ou presença de fístulas (RUGGIERO et al., 2014). Exames imaginológicos se tornam essenciais no diagnóstico de ONM, pois novos estudos apontam que há casos em que apenas a investigação por radiografia é capaz de detectar áreas osteonecrose, mesmo na ausência de sinais clínicos (HUTCHINSON et al., 2010). Os dados epidemiológicos da osteonecrose dos maxilares são inconsistentes, visto que esta doença não apresenta um código

específico na Classificação Internacional de Doenças (CID) específico, e há subnotificação aos sistemas de vigilância (CAMPISI, 2014).

Atualmente essa afecção é associada a outros medicamentos antirreabsortivos além dos BFs tal como o denosumab (QAISI et al., 2016; PETKOVA; STANIMIROV, 2017), e recentemente foram incluídos na lista de potencial causador de ONM drogas antiangiogênicas como Bevacizumab e Vatalanib (TENORE et al., 2014). Porém, outras drogas da classe dos medicamentos antirreabsortivos como o ranelato de estrôncio (RE), droga indicada para o tratamento de osteoporose pós-menopausa, não estão associados a essa doença na literatura. O mecanismo de ação deste medicamento ainda não está completamente compreendido, porém estudos *in vitro* apontam que o RE atua estimulando a replicação de células consideradas osteoprogenitoras (TAN et al., 2014).

Assim o RE pode ser um agente de potencial interesse clínico para doenças onde há reabsorção e remodelação óssea, visto que interfere em sua homeostase. Na literatura há relatos de indução de ONM por diversas drogas antirreabsortivas, mas não há artigos que relatem essa desordem causada por RE ou o possível tratamento da mesma com este fármaco. Sendo assim o presente trabalho visa avaliar os efeitos desta droga sobre o tecido ósseo em ratas ovariectomizadas, tratadas ou não com BF.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bifosfonatos

Os BFs são fármacos potentes inibidores da reabsorção óssea, constituídos por uma estrutura semelhante ao pirofosfato endógeno, porém este, não pode ser empregado como agente terapêutico no tratamento de doenças ósseas, pois sofre rápida hidrólise enzimática. Os BFs apresentam alta afinidade por cálcio, e são considerados potentes inibidores da atividade osteoclástica, se acumulam por longos períodos na matriz óssea mineralizada (KOBAYASHI et al., 2009). Diferentemente do ácido pirofosfórico, os BFs contêm dois grupos fosfonatos ligados um a um ao átomo de carbono central (estrutura P-C-P), o que lhes proporciona alta resistência à degradação enzimática e maior tempo de meia vida (RODAN; FLEISCH, 1996). Os BFs possuem 2 cadeias laterais R1 e R2 ligadas ao átomo de C central, isso permite que ocorra mudanças que alterem as características biológicas, químicas e toxicológicas destes fármacos (ROGERS, M. J. et al., 2011).

Os BFs podem ser classificados em não nitrogenados/simples (S-BF) e BF nitrogenados (N-BF) de acordo com a composição da cadeia R2 (EBETINO et al., 2011). Os N-BF, por apresentar o átomo N em sua composição, possuem maior potência na inibição da reabsorção. Porém a estrutura R2 pode apresentar muitas variações entre os N-BF, fazendo com que cada droga possua um mecanismo de ação e potência específicos (RUSSELL, 2011), sendo que quanto maior a cadeia lateral R2 com o átomo N, maior seria a potência das drogas.

Existem três gerações de bifosfonatos. A primeira é composta pelos não nitrogenados, que inclui os análogos de adenosina trifosfato (ATP) etidronato, clodronato e o tiludronato. A segunda e a terceira gerações são compostas pelos nitrogenados. Os da segunda geração, alendronato, pamidronato e ibandronato, são de 10 a 1000 vezes mais potentes que os da primeira (TABELA 1). Os da terceira geração contêm uma cadeia cíclica, sendo seus representantes o risedronato e o zoledronato. Este último, cuja potência é 100 a 850 vezes superior à do pamidronato é considerado o BF de maior potência (MAJOR et al., 2001).

Tabela 1- Lista de BF disponíveis, nome comercial, via de administração, estrutura das cadeias R1 e R2 e potências relativas em comparação ao etidronato.

Substância	Nome comercial	Via administração	Cadeia R1	Cadeia R2	Potência relativa
Etidronato	Didronel	VO	-OH	-CH3	1X
Clodronato	Ostac	VO / IV	-CL	-CL	10X
Pamidronato	Aredia Pamidron	IV	-OH	-CH2- CH2-NH2	100X
Alendronato	Fosamax Alendil	VO	-OH	-CH2- CH2- NH2- NH2	1.000X
Risedronato	Actonel Osteotrat	VO	-OH	CH2-3- piridina	5.000X
Ibandronato	Bondronat Bonviva	VO / IV	-OH	CH2- CH2- N(CH3)- (pentyl)	10.000X
Ácido Zoladrônico	Zometa Aclasta	IV	-OH	CH2- imidazone	20.000X

Fonte: (MIGLIORATI et al.,2010) adaptado.

2.1.1. FARMACOCINÉTICA

Os BFs que são administrados oralmente têm baixa taxa de absorção pelo organismo, sendo esta inferior a 1% da dose administrada (DRAKE; CLARKE; KHOSLA, 2008). Quando ocorre administração intravenosa, o fármaco é removido do plasma com maior velocidade e sua taxa de absorção pode chegar a 60% (BOCK; FELSEMBERG, 2008). Quando não ocorre a metabolização pelo tecido ósseo, a excreção renal é a única rota de eliminação (MILLER et al., 2013). Já quando ligado ao osso, os BFs só são liberados mediante a eventos de reabsorção e remodelação. Este fármaco tem efeito cumulativo no tecido ósseo, porém pesquisas sugerem, que apenas a parte que se encontra na superfície óssea é ativa, sendo assim há necessidade de reposição (SATO et al., 1991).

2.1.2 MECANISMO DE AÇÃO

A conformação química dos BFs determina sua potência, sua fixação ao osso e efeitos causados às células (RASMUSSEN; ABTAHI, 2014). Após administrado, os

BFs mantêm-se em altas concentrações no osso por um período de tempo prolongado em forte ligação com os cristais de hidroxiapatita (CATTALINI et al., 2012). Os dois efeitos biológicos fundamentais são: inibição da calcificação e inibição da reabsorção óssea. Apesar dos diferentes grupos de BF atuarem por caminhos diferentes, todos resultam na diminuição do desempenho osteoclástico e na indução da apoptose osteoclástica (VAN BEEK; LÖWIK; PAPAPOULOS, 2002).

Os BFs têm seus mecanismos de ação intimamente ligados a presença de nitrogênio na sua estrutura química. N-BF, com a maior potência desta classe de fármacos, possuem efeito na atividade osteoclástica e em células tumorais (SUZUKI et al., 2006). Como resultado desta droga, ocorre a suspensão da sinalização intracelular das proteínas levando a uma inativação da GTPase, por fim, há interferência nos caminhos de transmissão de sinais de citocina como *Rab*, que são utilizadas para garantir a eficiência e especificidade do transporte de compartimentos dentro de uma célula (HUTAGALUNG; NOVICK, 2011). Essas mudanças influenciam a reabsorção óssea e causam defeito na morfologia dos osteoclastos, assim como sua organização citoesquelética, ou seja, o efeito sobre esta célula ocorre em vários níveis: inibição do recrutamento, diminuição do tempo de vida, inibição da atividade, superfície óssea e ativação da apoptose (MAAHS, M. P. et al., 2011). Também há evidência de que os BFs influenciem na diferenciação de células pré-osteoblásticas (CÓRDOVA et al, 2016).

Mesmo que a ação dos BFs ainda não esteja totalmente elucidada, há fortes indícios sobre seu efeito antiangiogênico (OR et al., 2013). A angiogênese é responsável pela resposta ao aumento da massa tecidual e alterações na tensão de oxigênio, sendo que o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) aumenta com a hipóxia (KROCK; SKULI; SIMON, 2011). Para os adultos sob condições fisiológicas, a angiogênese ocorre apenas em momentos específicos como a consolidação de fraturas e remodelação pós exodontia. O efeito antiangiogênico do bifosfonato foi comprovado em estudos realizado em animais, propriedade que respalda seu emprego no tratamento de doenças ósseas malignas e também de outras enfermidades ósseas com componente angiogênico (WOOD, 2002).

2.1.3 INDICAÇÕES

Os BFs são prescritos no tratamento de enfermidades com repercussão no metabolismo e homeostase óssea (ARANTES; SILVA; LAZARETTI-CASTRO, 2010). Para crianças, o uso limita-se a casos de osteoporose localizada ou generalizada, enfermidades metabólicas ósseas, calcificações de tecidos moles, condições de hipercalcemias e hiperparatireoidismo primário (SZALAY, 2014; BARONCELLI; BERTELLONI, 2014). Em adultos, os BFs são empregados no manejo de alterações do cálcio e do metabolismo ósseo, em momentos que atividade osteoclástica seja considerada excessiva (KHAJURIA; RAZDAN; MAHAPATRA, 2011).

Os BFs são indicados no tratamento da hipercalcemia moderada a severa, associada ao câncer e de lesões osteolíticas juntamente a agentes quimioterápicos. Também são empregados no tratamento da doença de Paget e para metástases ósseas de câncer (SETON; KRANE, 2007). O zoledronato tem sido o tratamento de eleição para hipercalcemia e dor óssea associadas a neoplasias malignas e no tratamento de metástases (GLEZERMAN; STERNLICHT, 2015). Os BFs de administração oral são mais indicados para o tratamento da osteoporose (ERIKSEN, 2011).

2.1.4 EFEITOS ADVERSOS

Apesar de seus efeitos adversos, os BFs e suas duas vias de administração são bem tolerados. Os que são administrados via oral, possuem como efeitos colaterais comuns as dores de cabeça, dispepsia, diarreia e constipação (SKREPNEK et al., 2010). Quando administrados por infusão venosa, os efeitos adversos mais comuns relatados são: o aumento da temperatura corporal e sintomas semelhantes à gripe, ambos podem ser controlados com analgésicos e antipiréticos (MOTTAGHI, 2010). Úlceras gástricas e estenose esofágica também foram descritas (MORDEN et al., 2014). Entre os efeitos adversos bucais, ulceração do assoalho de boca e a osteonecrose dos maxilares têm sido reportadas (BENLIDAYI; GUZEL, 2013).

2.2 RANELATO DE ESTRÔNCIO

O ranelato de estrôncio (RE) é uma droga de uso oral, desenvolvida para o tratamento e prevenção de osteoporose pós menopausa e senil (SOZEN; OZISIK; BASARAN, 2017). A importância atualmente deste fármaco decorre de suas

qualidades químicas, que lhe conferem um mecanismo de ação único sobre o osso (CIANFEROTTI; D'ASTA; BRANDI, 2013).

O RE foi aprovado para o tratamento da osteoporose em países europeus no ano de 2004 (KHAJURIA; RAZDAN; MAHAPATRA, 2011). Nos Estados Unidos, não é aprovado pelo FDA, devido a seus efeitos adversos como erupções cutâneas e trombose venosa profunda, mas é licenciado para formulação oral (2g/dia) para uso restrito na prevenção de fraturas osteoporóticas vertebrais e não vertebrais, em pacientes em que o uso de bifosfonato não foi satisfatório ou quando há contraindicações para seu uso (CROCKETT; DAS, 2013).

O fármaco deve ser administrado na dose de 2g/dia. Se apresenta em sachês sob a forma de grânulos que deve ser suspenso em água e ingerido no período da noite. Caso seja prescrito juntamente com suplementação cálcica, esta deve ser tomada em período diferente daquele para evitar que sua absorção seja reduzida. A ingestão de alimentos, leite e derivados lácteos deve ser pelo menos 2 horas antes do RE (BLAKE; FOGELMAN, 2006).

2.2.1 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS

O RE é constituído por dois átomos de estrôncio (Sr) estáveis e uma molécula de ácido ranélico. Sendo um metal alcalino-terroso, o Sr possui muitas semelhanças com o cálcio, como absorção intestinal, incorporação óssea e eliminação renal (MEUNIER et al., 2004).

Uma vez ingerido, o RE se divide em íons estrôncio (Sr^{2+}) e ácido ranélico. O ácido constitui a parte orgânica do composto, farmacologicamente inativa do RE, por apresentar alta polaridade, este confere ao fármaco uma baixa absorção, distribuição e ligação a proteínas plasmáticas (MARIE, 2005). O Sr constitui de uma parte inorgânica farmacologicamente ativa do RE. Assim, efeitos do RE no metabolismo ósseo correspondem aos efeitos produzidos pelo Sr (LLINAS et al., 2006).

Com relação à farmacocinética, os íons Sr^{2+} apresentam grande afinidade pelo tecido ósseo, sua incorporação a superfície do osso rica em hidroxiapatita acontece pela substituição iônica com o cálcio (FROMIGUÉ, 2009). Após sua absorção, o Sr é quase totalmente incorporado ao osso. Porém, alguns fatores como, dose, níveis plasmáticos de RE, gênero, duração do tratamento e localização esquelética, podem

ser diretamente proporcionais à quantidade de Sr incorporada ao osso (OLIVEIRA et al., 2012).

2.2.2 MECANISMO DE AÇÃO

O RE tem demonstrado afetar as células ósseas e o metabolismo do osso *in vitro* e *in vivo*. Dependendo da dose, demonstrou influenciar na remodelação óssea pela inibição da reabsorção e estímulo da formação óssea (CANALIS, 2010; MARIE; FELSENBURG; BRÀNDI, 2010).

O mecanismo de ação do RE ainda não está completamente elucidado, mas tem sido sugerido, que a via de sinalização através da qual a droga pode controlar a atividade dos osteoclastos, é a ativação de receptores sensíveis ao cálcio extracelular. O uso do Ranelato de Estrôncio tem mostrado um aumento na formação e na expressão de marcadores osteoblásticos (BONNELYE et al., 2008), o que pode explicar o aumento da formação óssea encontrada. Além disso, observou -se que RE aumenta os níveis de expressão e de proteínas de osteoprotegerina (OPG), bem como reduz os níveis de RANKL (CIANFEROTTI; D'ASTA; BRANDI, 2013).

Dessa forma, o RE atua sobre o metabolismo ósseo e regula o balanço necessário entre RANK, RANKL e OPG gerando um equilíbrio essencial para o controle da osteoclastogênese e reabsorção óssea (BRENNAN et al., 2009).

2.2.3 EFEITOS ADVERSOS

RE pode ser considerado um fármaco aceitável e eficaz apesar de seus colaterais. Em algumas situações, pode ocorrer erupções cutâneas com eosinofilia e trombose venosa profunda (CROCKETT; DAS, 2013). Outros efeitos mais comuns do RE são: náusea, diarreia, cefaleia e dermatite, sendo que estes são mais comuns nos três primeiros meses de tratamento (ORTOLANI; VAI, 2006).

Com a criação do *Committee at the European Medicines Agency* (EMA) no ano de 2012, observou-se um possível aumento da incidência de infarto do miocárdio, o que levou a uma mudança nas indicações do RE. Este passou a ser recomendado a pacientes com osteoporose grave para os quais o tratamento com outros medicamentos não é possível (REGINSTER et al., 2015).

Outro ponto de contraindicação foi para pacientes com hipertensão não controlada e aqueles com histórico estabelecido, atual ou passado de cardiopatia (PILMANE et al., 2017).

2.3 OSTEONECROSE DOS MAXILARES ASSOCIADA AO USO DOS BFS (ONMB)

A ocorrência de necrose óssea associada ao uso de Bifosfonatos, vem sendo descrita por Marx desde 2003 como um efeito adverso, relacionada ao uso prolongado de deste fármaco. A Sociedade Acadêmica Americana de Cirurgiões Oral e Maxilo-Facial e a Sociedade Americana de Pesquisa Mineral e Óssea, apresentam como definição para ONMB como uma exposição de osso necrótico na região maxilo-facial, por mais de oito semanas, em pacientes sob uso de BFS sem a prévia de realização de radioterapia, pode estar associada ou não à dor e à infecção (SILVERMAN; LANDESBURG, 2009). Atualmente, devido ao aumento do número de fármacos relacionados ao desenvolvimento da osteonecrose dos maxilares, a ONMB passou a fazer parte de uma condição patológica maior que foi denominada osteonecrose dos maxilares associada ao uso de antirreabsortivos. Esta nova definição passou a abranger o desenvolvimento de osteonecrose nos 18 ossos gnáticos, independentemente do tipo de antirreabsortivo utilizado e do tempo de desenvolvimento, mas a condição excludente de radioterapia de cabeça e pescoço continua fazendo parte da sua denominação (OLIVEIRA et al., 2016).

2.3.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA OSTEONECROSE DOS MAXILARES

No início, os pacientes não apresentam manifestações clínicas específicas. Porém tardiamente, os pacientes podem apresentar dor pulsátil constante, intensificada pela movimentação da articulação, dor de cabeça, dor de ouvido, espasmo e dor da musculatura mastigadora, abertura bucal limitada, crepitação, fístulas cutâneas, fístulas oro-antrais, sinusite maxilar e fraturas patológicas, dentre outros sintomas (RUGGIERO; FANTASIA; CARLSON, 2006). Este transtorno pode evoluir, podendo surgir extensas áreas de exposição óssea e deiscência (FIGURA 1).



FIGURA 1 - Aspecto intra-oral de caso de ONMB na maxila, com presença de osso necrótico exposto, colapso do tecido mole e drenagem purulenta ativa. Fonte: ALMASAN et al. 2011.

Ruggiero et al. (2009), realizaram um importante trabalho e classificaram as ONMB de acordo com seu estágio clínico (TABELA 2).

Tabela 2 - Classificação dos estágios clínicos da ONMB.

Estágio	Característica Clínica
Pacientes de risco	Sem osso exposto/necrótico em pacientes que foram tratados com Bifosfonatos orais ou endovenosos
Estágio 0	Quando o paciente não apresenta aparente osso necrótico mas apresenta sinais clínicos e sintomas inespecíficos e alterações radiográficas
Estágio 1	Osso exposto/necrótico em pacientes assintomáticos e sem evidência de infecção.
Estágio 2	Osso exposto/necrótico associado com infecção e evidência de dor e eritema na região do osso exposto com drenagem purulenta.
Estágio 3	Osso exposto/necrótico em pacientes com dor, infecção e um ou mais dos seguintes sinais: fraturas patológicas, fistula extra-oral ou osteólise se estendendo às bordas da lesão.

Fonte: Adaptado de RUGGIERO et al., 2009

2.2.2 CARACTERÍSTICAS RADIOGRÁFICAS

Os exames complementares por imagem são essenciais para o fechamento do diagnóstico do paciente com ONMB. Para isso podem ser realizadas tomografias

computadorizadas (FIGURA 2), radiografias panorâmicas (FIGURA 3), ressonância magnética ou cintilografia óssea por tecnécio 99m. Além do diagnóstico estes exames são importantes para o monitoramento da progressão da doença. Os achados não são específicos e são encontrados em outras condições, tais como a osteomielite, osteorradionecroses e metástases de câncer. Os principais podem incluir osteólise, esclerose óssea e fracasso de remodelação pós-cirúrgica (ARCE et al., 2009).

Morag et al. (2009) realizou um levantamento dos possíveis achados nos exames imaginológicos (TABELA 3).

TABELA 3 -Possíveis achados imaginológicos em ONMB.

Sistema	Característica
Radiografia Panorâmica e Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico	Osteólise, lesões escleróticas, reação periosteal, estreitamento do trabeculado ósseo, envolvimento do canal alveolar inferior e fraturas patológicas
Ressonância Magnética Contraste T1	Tipicamente diminui a intensidade do sinal
Ressonância Magnética Contraste T2	Variável: pequeno ou moderado aumento na intensidade do sinal nas lesões jovens com aumento ou decréscimo em lesões antigas.
Cintilografia com tecnécio 99m	Áreas de baixa captura podem se apresentar nas lesões jovens; em estágios avançados há um aumento da captura do radio-isótopo com interrupções focais centrais.
Material de contraste Ressonância Magnética	Variável: pode se correlacionar com o decréscimo da intensidade do sinal nas imagens com contraste T1 e tipicamente apresenta interrupções no contraste T2 sugestivo de sequestros ósseos.

Adaptado de MORAG et al., 2009

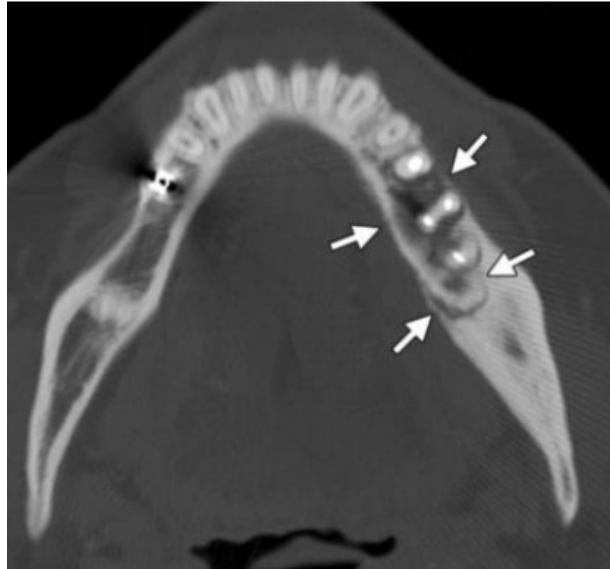


FIGURA 2- Aspecto imaginológico (tomografia computadorizada de feixe cônico, corte axial) da ONMB. As flechas indicam áreas de fenestração óssea e sequestros ósseos. Imagem de RUGGIERO; FANTASIA; CARLSON, 2006.



FIGURA 3 - Radiografia panorâmica mostra defeito ósseo extenso do lado esquerdo (deiscência) após perda dos implantes. A seta indica área de sequestro ósseo, considerada uma das características das ONM Fonte: LAZAROVICI et al. 2009.

2.2.3 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS

Histologicamente, a ONM associada ao uso de Bifosfonatos apresenta-se como osso necrótico (sem a presença de osteócitos), ou seja, com lacunas vazias em abundância, sendo que mais de 8 lacunas adjuntas sem osteócitos considera-se quadro de osteonecrose (PACHECO et al., 2015) (FIGURA 4). Há uma considerável redução na quantidade de vasos sanguíneos. Os osteoclastos apresentam-se com

drásticas modificações em seu formato e na sua quantidade (CÓRDOVA et al., 2016). Pode apresentar colônias bacterianas associadas e tecido de granulação (HOWIE et al., 2015). Microorganismos do gênero *Actinomyces* foram identificados no exame histopatológico na maioria dos casos apresentados na literatura (LAZAROVICI et al., 2009). No entanto, o papel real deste microorganismo na patogênese da ONMB, não está bem esclarecido.

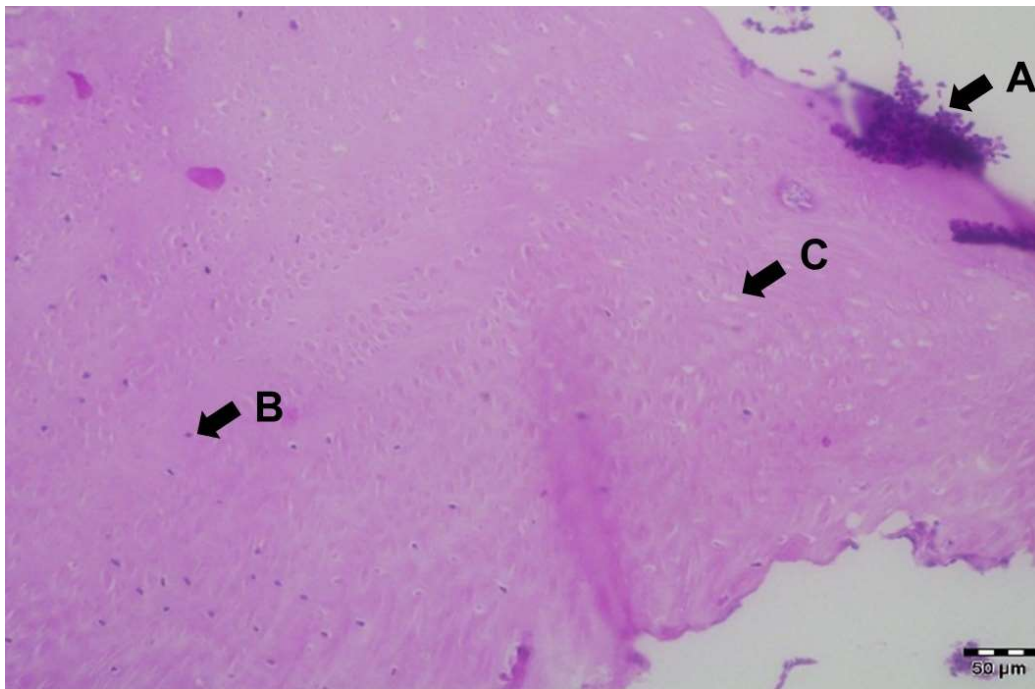


FIGURA 4 - Apresenta as características histológicas da ON, corada com hematoxilina e eosina. A: colônias de bactérias associadas ao tecido necrótico; B: Poucos osteócitos presentes; C: Lacunas vazias adjuntas. (Fonte o autor).

2.2.4 FATORES DE RISCO

A identificação de fatores de pré-disposição tem sido considerada o método mais eficiente para prever o surgimento de ONM. Os principais fatores de risco descritos para o desenvolvimento desta patologia foram: história de exposição a Bifosfonato variando sua via de administração e também seu tempo de uso, além de medicações concomitantes como estrogênio e corticoides. Fatores sistêmicos, condições médicas de doença com alteração metabólica óssea ou inflamatória e até mesmo idade e gênero. Por fim, fatores de risco locais como higiene dental deficiente, trauma e doença periodontal. (KHOSLA et al., 2007; TSAO et al., 2013).

O trauma causado pelas exodontias é considerado o principal fator de risco à ONMB, aumentando a prevalência de ONMB de 17 até 299 vezes a mais que a realização de implantes osseointegrados seguido por procedimentos de alveoloplastias. Até mesmo procedimentos odontológicos não invasivos, como o tratamento endodôntico, aumentam o risco de desenvolvimento dessa doença (BARASCH et al., 2011). A doença periodontal, por apresentar um forte caráter inflamatório, similar ao que acontece fisiologicamente com as exodontias, constitui um importante fator de risco à ONMB (DINIZ-FREITAS et al., 2012). Todos fatores de risco, independente se locais ou sistêmicos, possuem em comum um forte caráter inflamatório, o que mostra ter relação com a ONMB.

A infecção também tem sido citada como um fator de risco ao surgimento de ONMB, no entanto, a patogênese parece estar mais fortemente relacionada à desregulação do sistema imune/ inflamatória (LÓPEZ-JORNET et al., 2010). Os BFs aumentam a adesão microbiana na hidroxiapatita, o que potencializa os eventos pró-inflamatórios supracitados induzidos pelos BFs, por isso, não se recomenda a antibioticoterapia, isoladamente, no tratamento da ONM (NORTON et al., 2012).

2.2.5 TERAPÊUTICA

O tratamento da osteonecrose é complexo e controverso. As normas são recomendadas de acordo com o estágio da lesão, cabendo ao profissional de saúde a difícil tomada de decisão quanto ao procedimento mais adequado para cada caso visto que nenhuma modalidade terapêutica tem total eficácia para ser amplamente utilizada (RODRIGUEZ-LOZANO; OÑATE-SANCHEZ, 2016). Por tratar-se de uma condição relativamente nova, não há um protocolo terapêutico baseado em evidências. Os tratamentos instituídos variam de acordo com a experiência e resultados de cada profissional ou instituição (RUGGIERO, 2014).

A falta de uma conduta terapêutica adequada torna a ONM uma condição ainda mais complexa. A exposição do tecido ósseo na cavidade bucal aumenta a probabilidade de uma infecção local, pois o perfil microbiológico não se altera com antibioticoterapia, podendo evoluir para casos mais graves em pacientes imunocomprometidos, decorrente do tratamento oncológico (RUPEL et al., 2014).

Os principais objetivos do tratamento da osteonecrose são reduzir a dor, controlar a infecção dos tecidos duros e moles e minimizar a ocorrência ou progressão

de necrose óssea. A prevenção assume um papel de suma importância na diminuição do risco de aparecimento da osteonecrose, passando de uma incidência 3% para 0,7% quando este tipo de medida é tomada, sendo recomendado que o paciente, antes de iniciar a terapêutica com BFs, seja submetido a uma avaliação dentária minuciosa e caso seja necessário, efetue tratamento (NOMURA et al., 2013).

Os elementos para alcançar o sucesso no tratamento da ONM ainda não estão totalmente identificados, apesar de alguns fatores parecerem essenciais, como a remoção de todo o osso necrosado, a realização de tratamentos dentários profiláticos por rotina, a redução da carga microbiana associada às lesões de ONM e o encerramento justo e livre de tensão dos bordos da ferida no caso de abordagem cirúrgica (RUGANI et al., 2014).

Ruggiero et al. (2014) formularam uma recomendação baseada na “American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) ” sobre as estratégias de tratamento da ONM de acordo com o estágio da doença (TABELA 4).

TABELA 4 - Estratégias de tratamento para os diferentes estágios de ONMB

Estágio da BRONJ	DESCRIÇÃO	ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO
Pacientes em risco	Sem osso necrótico aparente em pacientes que foram sujeitos a terapêutica com bifosfonatos	· Sem indicação de tratamento · Educação do paciente
Estágio 0	Sem evidência clínica de osso necrótico, mas achados clínicos, alterações radiográficas e sintomas não específicos.	• Manuseamento sistêmico, incluindo medicação para a dor e antibióticos
Estágio 1	Osso exposto e necrótico ou fístulas originadas no osso em pacientes assintomáticos e sem sinais de infecção.	• Bochechos com antibacterianos • Acompanhamento clínico trimestral. • Educação do paciente e avaliação das indicações para a continuação da terapêutica com bifosfonatos.
Estágio 2	Osso exposto e necrótico ou fístulas originadas no osso associadas a infecção evidenciada por dor e eritema na região de exposição óssea com ou sem drenagem purulenta	• Tratamento sintomático com antibióticos orais • Bochechos com antibacterianos • Controle da dor • Desbridamento para aliviar a irritação do tecido mole e controlar a infecção

Estágio 3

Osso exposto e necrótico ou fístulas originadas no osso associadas a infecção com um ou mais dos seguintes: osso necrótico exposto com extensão além da região do osso alveolar (ramo e bordo inferior na mandíbula, seio maxilar e zigomático na maxila) resulta em fratura patológica, fístula extraoral, comunicação oronasal ou oroantral ou osteólise com extensão ao bordo inferior da mandíbula e chão sinusal

- Bochechos com antibacterianos
- Terapia antibiótica e controle da dor
- Desbridamento cirúrgico ou recessão para tratamento paliativo a longo prazo da infecção e dor.

Fonte (RUGGIERO et al.,2014)

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar se o fármaco ranelato de estrôncio causa quadros de osteonecrose durante o reparo do osso alveolar em modelo animal, submetido a exodontia, após tratamento prévio ou não com bifosfonato.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar radiograficamente: presença de sequestros ósseos, qualidade do reparo ósseo; mensurar a densidade óssea.
- Quantificar histologicamente: número de osteócitos e lacunas vazias; número de osteoclastos; avaliar o aumento ou diminuição de vasos sanguíneos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Após a aprovação do comitê de ética na experimentação animal sob o número de protocolo 031/2016, o presente experimento utilizou 48 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), provenientes do biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) (Ponta Grossa/Paraná-Brasil), com tempo de vida em torno de 90 dias, sendo este período considerado ideal para a realização de modelo para osteoporose visto, sua alta taxa de remodelação óssea (KALU, 1991). O peso dos animais variou entre 250 a 260 gramas.

A manipulação animal, foi respaldada pela lei nº 11794, de 8 de outubro de 2008. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno, revestidas com maravalha, mantidas em estantes verticais no próprio biotério da UEPG, no regime 12/12h (claro e escuro), com temperatura controlada de 25°C, alimentados com dieta comercial normoproteica e água natural (*ad libitum*), até o início do experimento, seguindo as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação animal (COBEA).

4.2 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO AMOSTRAL

O cálculo amostral foi realizado com base nos dados de YANIK et al. (2016), que em seu experimento animal induziu ONM a partir de ácido zoledrônico (AZ) e tratou ou não com vitamina D. Foi adotado um nível de significância de $p=0,05$. Os cálculos foram realizados com base na média e desvio padrão, esperando um poder do teste em 80%. Assim, o tamanho amostral foi estabelecido com base na variável ONM. Para uma diferença mínima detectável entre as médias de 5,0% e um desvio-padrão esperado dos resíduos de 1,2. Sendo obtido o resultado de $n=10$. Os autores consideraram a inclusão de mais dois animais para cada grupo, prevendo possíveis perdas e exclusões durante o decorrer do experimento, totalizando um “n” amostral de doze animais. Todos os cálculos foram realizados utilizando o programa GPower 3.1.

4.3 INDUÇÃO DA OSTEOPENIA ATRAVÉS DE OVARIECTOMIA (OVX).

Ratas ovariectomizadas (OVX) têm sido preconizadas como modelo animal de osteoporose experimental, pois fornecem dados semelhantes aos observados no esqueleto adulto pós-menopáusico (KALU,1991). Porém este modelo não apresenta fraturas causadas por trauma obtido através da aplicação de cargas de baixa magnitude, por serem animais quadrupedes. Mas, essa desvantagem que o modelo apresenta, pode ser contornada com a utilização de técnicas para avaliar a resistência biomecânica do tecido ósseo (FROST, 1997).

O quadro de osteopenia é alcançado através da remoção bilateral dos ovários. O protocolo desse procedimento foi sugerido por Zarrow et al. (1964) e inicia-se com a pesagem dos animais e anestesia intraperitoneal (IP) com solução de quetamina (80mg/kg) e relaxante muscular xilazina (40mg/kg).

Os flancos direito e esquerdo foram tricotomizados e assepsiados (FIGURA 5.1). Após a verificação dos reflexos (FIGURA5.2), realizou-se incisão transversal de 1 cm com tesoura de ponta romba entre o bordo superior da coxa e a última costela e a exposição do tecido muscular (FIGURA 5.3). A incisão muscular foi feita para dar acesso a cavidade intraperitoneal (FIGURA 5.4).

Com a pinça anatômica, a gordura periovariana foi encontrada, o ovário foi identificado e exteriorizado e pinçado com pinça hemostática (FIGURA5.5). Com fio reabsorvível, as tubas uterinas e artérias ováricas sofreram uma ligadura (FIGURA5.6). Por fim, com auxílio de bisturi o ovário foi removido (FIGURA 5.7). A gordura periovariana foi reposicionada na cavidade abdominal e a sutura realizada nos planos muscular (fio reabsorvível) (FIGURA5.8) e cutâneo (fio de seda) (FIGURA 5.9) sob análise do sangramento. A ferida cirúrgica foi limpa com soro fisiológico. Os animais foram transferidos para uma gaiola individual e aquecidos para minimizar os efeitos hipotérmicos provocados pelo anestésico.

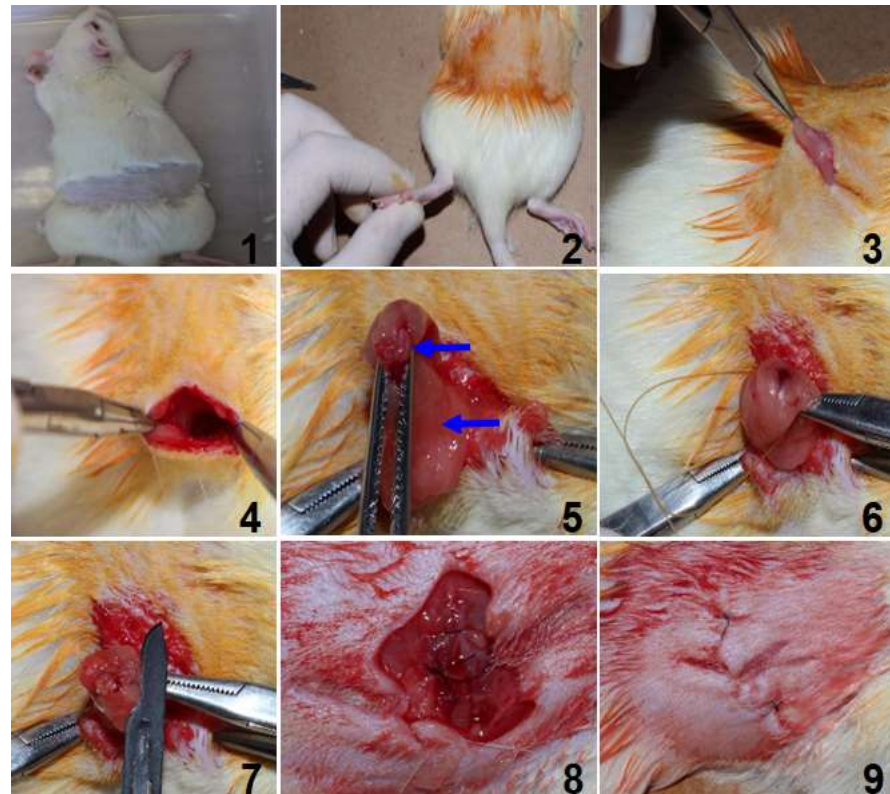


FIGURA 5- Passos da ovariectomia. 1-Tricotomia bilateral; 2: Teste de sensibilidade; 3: Exposição do músculo; 4: Pinçamento em bloco e acesso a cavidade intraperitoneal; 5: Gordura periovariana e exposição do ovário em formato de 'amora'; 6: Ovário 'laçado'; 7: Remoção do ovário com bisturi; 8: Sutura no plano muscular; 9: Sutura na pele dos animais.

4.4 DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Quatro semanas após a OVX, período estipulado por Zhou et al., (2015) como necessário para a recuperação dos animais, estes foram aleatorizados em 4 grupos seguindo o delineamento experimental (FIGURA 6).

Foram excluídos 8 animais que morreram após o procedimento de OVX.

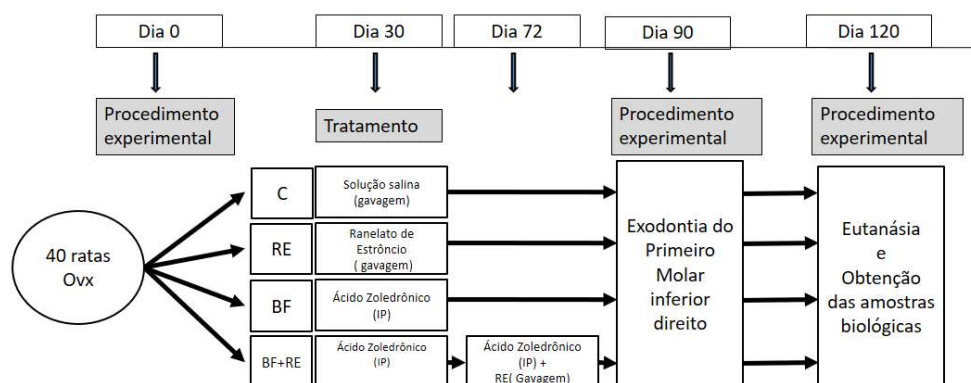


FIGURA 6 - Delineamento experimental.

4.5 GAVAGEM DE SOLUÇÃO SALINA E RANELATO DE ESTRÔNCIO

Após 30 dias da realização da OVX, iniciou-se a administração de solução salina no grupo C e RE 625mg/Kg/dia no Grupo RE, por oito semanas. Essa dosagem fica próximo dos 2g/dia administrados em humanos, confirmado a partir dos cálculos sugeridos por Reagan-shaw, Nihal e Ahmad (2007) (FIGURA 7). Essa discrepância de valores se dá pela redução da absorção intestinal do Ranelato em ratos (AMMANN et al., 2004). Para gavagem, eram retiradas a alimentação e água antes e após do procedimento de ambos os grupos como recomendado na bula do medicamento. A via de administração utilizada foi a mesma que se recomenda em humanos.

$$\text{HED (mg/kg)} = \text{Animal dose (mg/kg)} \text{ multiplied by } \frac{\text{Animal } K_m}{\text{Human } K_m}$$

HED: dose equivalente a humanos; K_m factor: valores baseados em cálculos BSA médias para humanos e animais

FIGURA 7 - Cálculo da quantidade de RE segundo Reagan-shaw, Nihal e Ahmad (2007).

Após 72 dias, o grupo iniciou a gavagem diária com RE, pressupondo um tratamento profilático, até o dia da eutanásia.

4.6 APLICAÇÃO DE ÁCIDO ZOLEDRÔNICO (AZ)

Após 30 dias da realização da OVX, optou-se por seguir a metodologia para o uso do AZ descrita por Keskinruzgar et al. (2016) que encontram em seus resultados sinais de necrose óssea. Foram realizadas 1 aplicação semanal IP 0,4 mg / kg nos grupos BF e BF+RE.

Os medicamentos foram aplicados após o jejum de 2 horas antes da aplicação (BRASIL, 2013) e o animal permaneceram desta maneira uma hora após a aplicação.

4.7 EXODONTIAS

Após pesagem sob efeito de anestesia geral dos animais, foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior direito e esquerdo. O procedimento foi feito com

o auxílio de sonda exploradora número 5 e pinças clínicas com dente de rato. Após a avaliação clínica do dente (FIGURA 8 A). Inicialmente a sonda foi colocada entre o primeiro e segundo molar (FIGURA 8 B e C) e realizado movimento de sarrilho. Em seguida a mesma foi posta entre as raízes para realizar o movimento de alavanca (FIGURA 8 D). Após a exteriorização do elemento dental (FIGURA 8 E e F), na ferida cirúrgica foi colocada uma broca de aço inoxidável de 1.0mm de diâmetro em motor a 15.000 rpm, utilizada para remover possíveis fragmentos de raízes dentro da loja cirúrgica. Ao término do procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos aquecidos e separados até o retorno da anestesia (HOWIE et al., 2015).

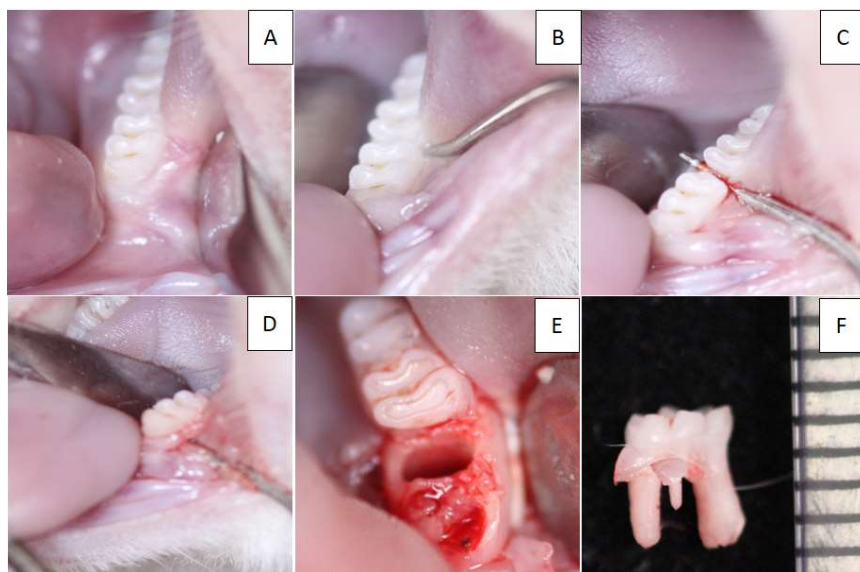


FIGURA 8- Sequência de exodontia, A: Dente hígido; B: Posicionamento da sonda entre a distal do primeiro molar e a mesial do segundo molar; C Luxação do primeiro molar; D: Posicionamento da sonda entre as raízes para evitar fraturas; E: Alvéolo sem a presença do dente; F: Dente fora do alvéolo.

4.8 PREPARO DAS AMOSTRAS

Após a eutanásia realizada por sobredose anestésica de xilazina e quetamina, as hemimandíbulas direita e esquerda foram dissecadas, removidos os tecidos moles e fixadas em formol a 10% durante 24 horas. Posteriormente, as amostras do lado direito seguiram para descalcificação em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 9% de concentração, para posterior histologia. Enquanto o lado esquerdo foi armazenado em álcool absoluto para desidratação e realização da análise visual, radiográfica.

4.9 ANÁLISE MACROSCÓPICA

As hemimandíbulas foram posicionadas em cera 7 com uma sonda milimetrada ao lado. As fotografias foram feitas com auxílio do sistema USB Digital Microscope e realizada a análise do aspecto ósseo. Analisou-se a presença ou ausência de fenestração e deiscência óssea. Por fim, avaliou-se caminhos fistulares que poderiam ter comprometido o tecido ósseo (ZANDI et al., 2015). O osso necrosado foi determinado através da observação visual em relação à largura (YANIK et al., 2016) (FIGURA 9).

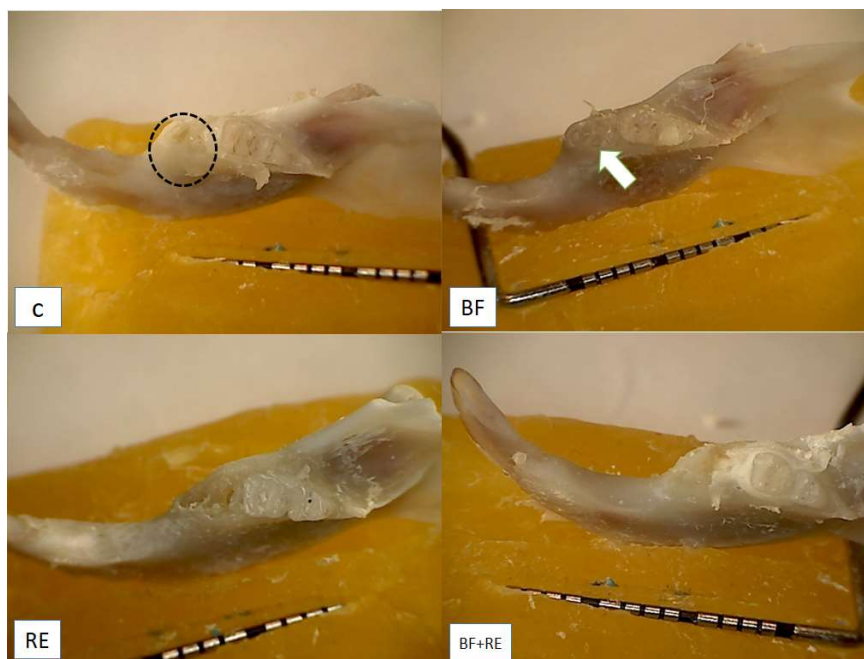


FIGURA 9 - Avaliação macroscópica da hemimandíbula esquerda. O círculo mostra a região avaliada durante a macroscopia. A seta aponta trajeto fistular, causando uma fenestração, encontrados nos grupos BF e BF+RE.

4.10 ANÁLISE RADIOGRÁFICA

As hemimandíbulas esquerda de todos os grupos foram radiografadas, utilizando o aparelho digital GE 1000 (General Electric Company, Milwaukee, Wisconsin, EUA). As hemimandíbulas foram posicionados paralelamente ao filme digital radiográfico, com uma distância de focagem 10 cm. O tempo de exposição estabelecido pelo o fabricante do dente anterior (0,18 s) foi utilizado para todas as amostras. A imagem digital foi obtida no “scanner” Digora (Soredex-Finndent, Orion Corporation, Helsinki, Finlândia).

Um examinador único, sem o conhecimento do experimento, avaliou as radiografias. Através da avaliação qualitativa, afim de visualizar áreas de sequestros ósseos (SO), raízes residuais(RR), remodelação óssea e cicatrização gradual (CG) no alveolo pós exodontia (JABBOUR et al., 2014; SILVA et al., 2015) (FIGURA 10).

As radiografias foram semi-quantitativamente analisadas usando o programa ImageJ (desenvolvido por Wayne Rasband do Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland) com a função escala de cinza, que contabiliza através de pixels a densidade expressa pela imagem.

Após a calibração do programa utilizando escala gradual de cinza (como descrita no manual de instruções) (FIGURA 11), o examinador expôs a imagem ao aumento de 200x para melhor observar o término da região a ser avaliada e com a ferramenta polígono (FIGURA 12), realizou-se a mensuração da área de turnover ósseo no alvéolo onde houve a exodontia e o programa forneceu a máxima, mínima e a média da escala de cinza.

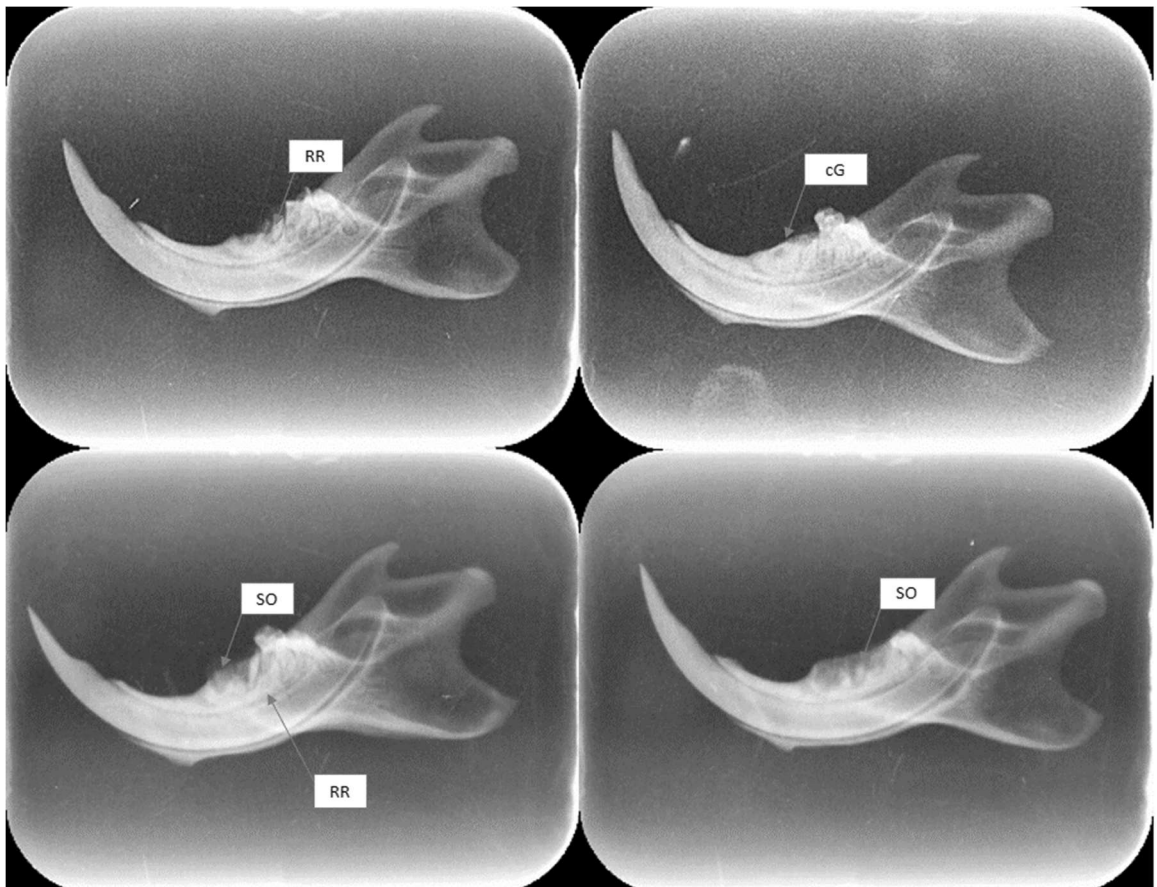


FIGURA 10 - Radiografias da hemimandíbula esquerda, com a presença de raiz residual (RR), sequestros ósseos (SO) e cicatrização gradual (cG).



FIGURA 11 - Ferramenta de calibração do programa ImageJ

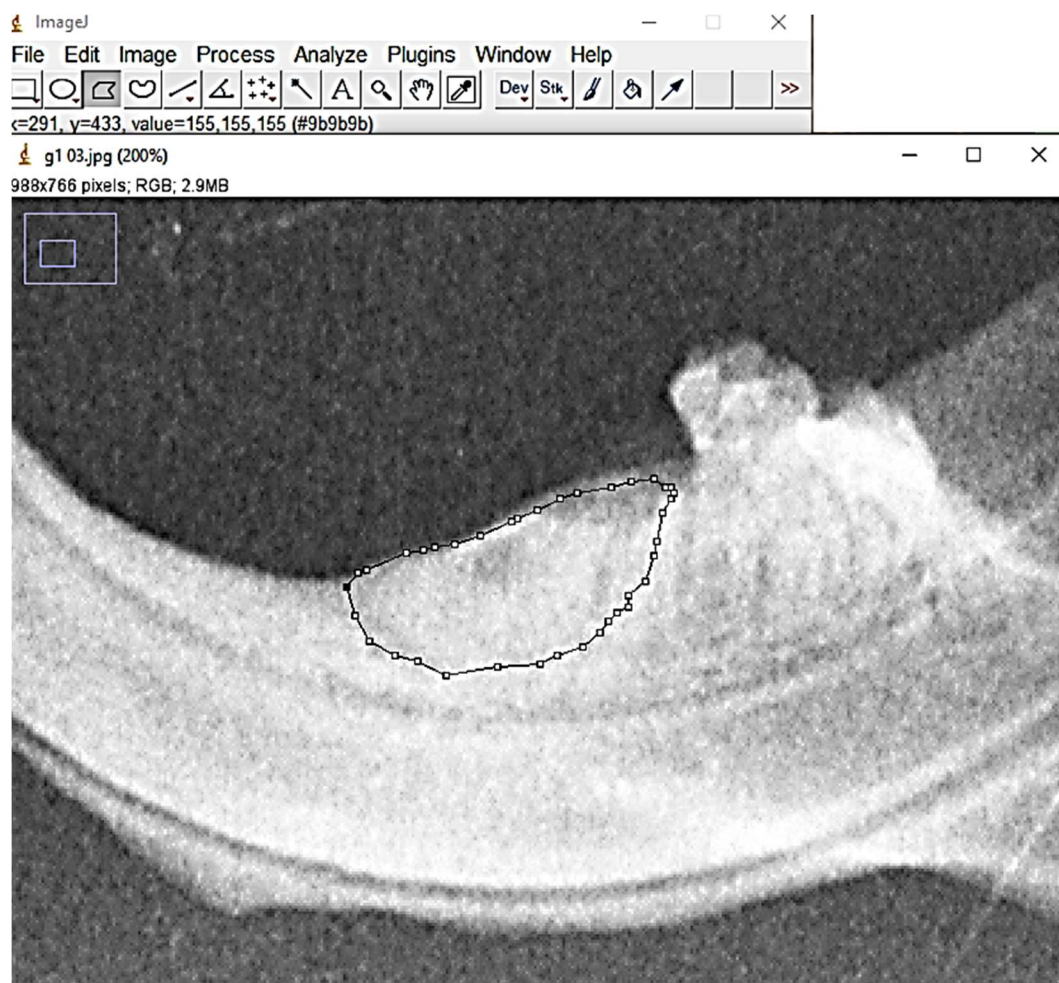


FIGURA 12 - Mensuração da área alveolar, para obtenção da escala de cinza.

4.11 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Antes de iniciar as análises histológicas, foi realizada a descalcificação com EDTA 9% com pH 7,5 por 30 dias, durante a qual os recipientes foram colocados em um agitador contínuo e a solução trocada a cada 2 dias (HOWIE et al., 2015). Após a confirmação da completa descalcificação, o material seguiu o processo de

desidratação, diafanização e impregnação de parafina usando um sistema semi-fechado (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL). As hemimandíbulas direita foram incluídas de modo a realizar cortes sagitais em blocos de parafina.

Foram realizadas secções de 5 micrômetros (μm) da zona de extração do dente e corados com hematoxilina e eosina pelos seguintes processos: desparafinização, hidratação, coloração, desidratação e montagem. Três áreas foram fotografadas com ampliação de 200x, (PACHECO et al., 2015) tomando como base a raiz mesial do segundo molar (FIGURA 13), em seu ponto mais apical, utilizando microscópio binocular Olympus.

Com o auxílio do programa ImageJ, através a ferramenta de pontos múltiplos em uma análise quantitativa, foi realizada a contagem de vasos sanguíneos, osteócitos, lacunas vazias e osteoclastos (FIGURAS 14, 15, 16 e 17). Observou-se também em uma análise qualitativa a presença e ausência de ON (presença de necrose óssea - áreas vazias mostram osteoblastos, mas não há osteócitos, sendo mais de 8 lacunas adjuntas sem a presença de osteócito considerada como osteonecrose) (FIGURA18).



FIGURA 13 –Os círculos representam as regiões fotografadas em maior aumento das lâminas coradas com hematoxilina e eosina.

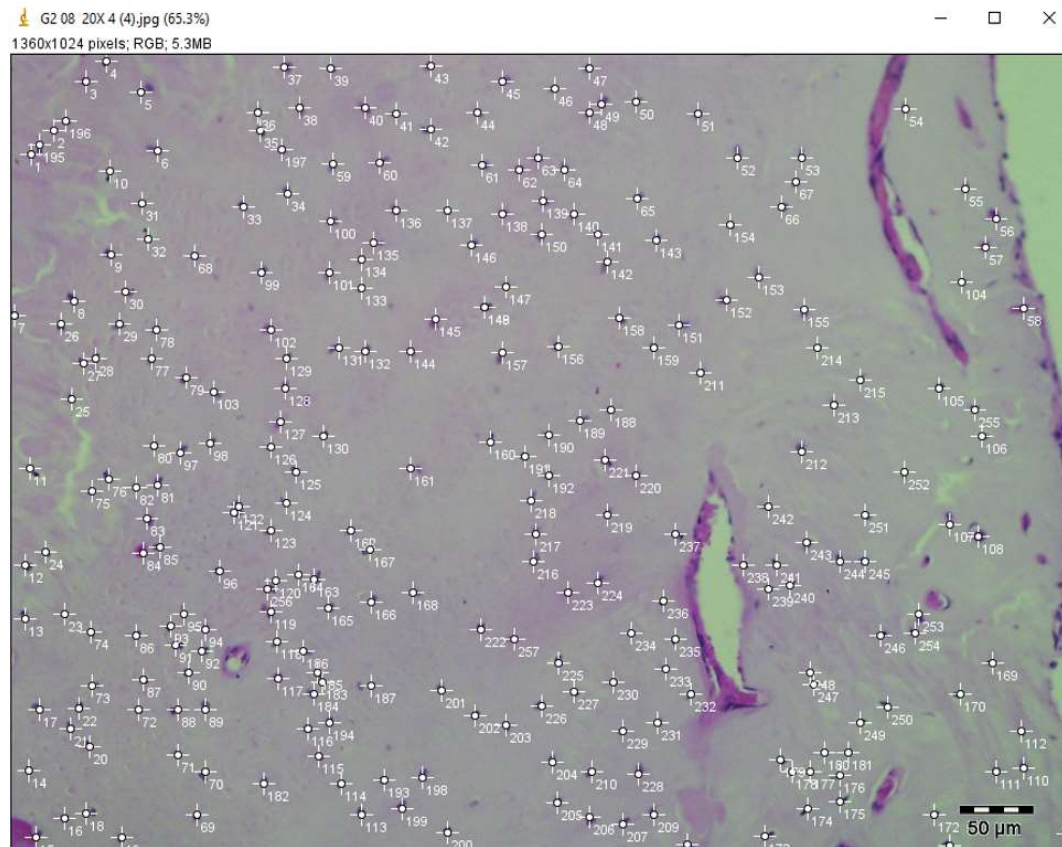


FIGURA 14 - Contagem de osteócitos na lâminas coradas com hematoxilina e eosina.



FIGURA 15 - Contagem de lacunas vazias nas lâminas coradas com hematoxilina e eosina.

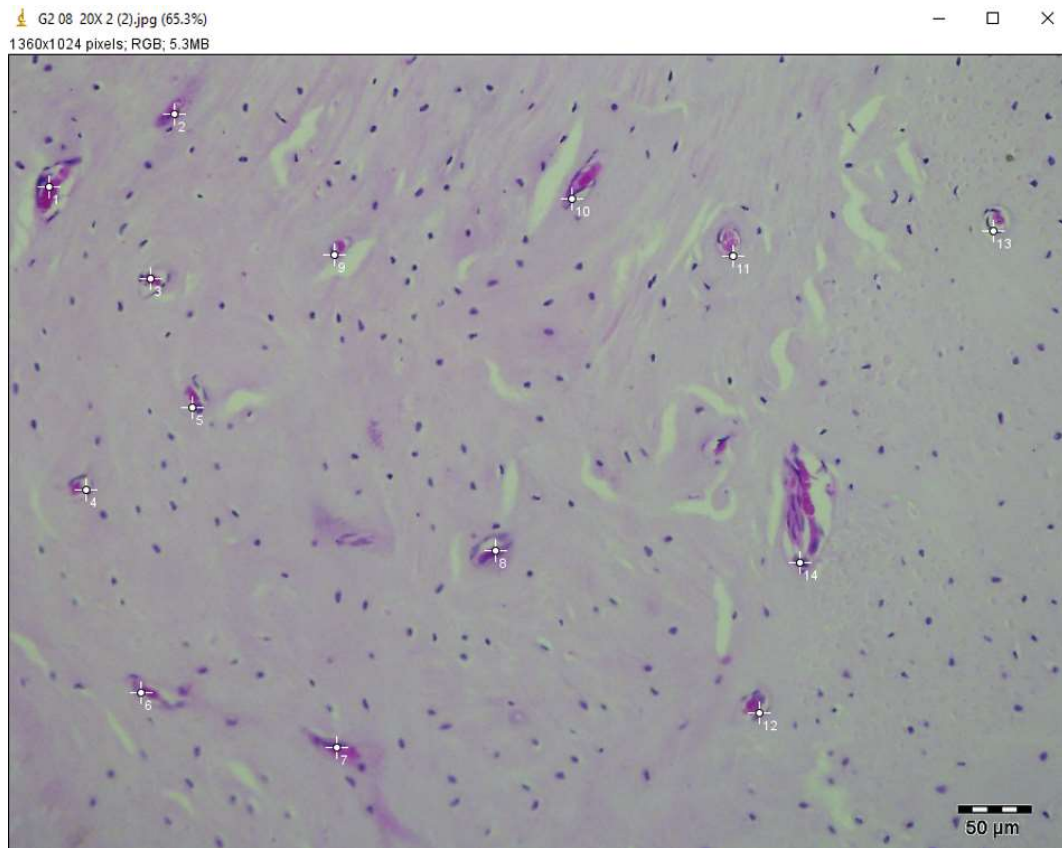


FIGURA 16 - Contagem de vasos sanguíneos nas lâminas coradas com hematoxilina e eosina.

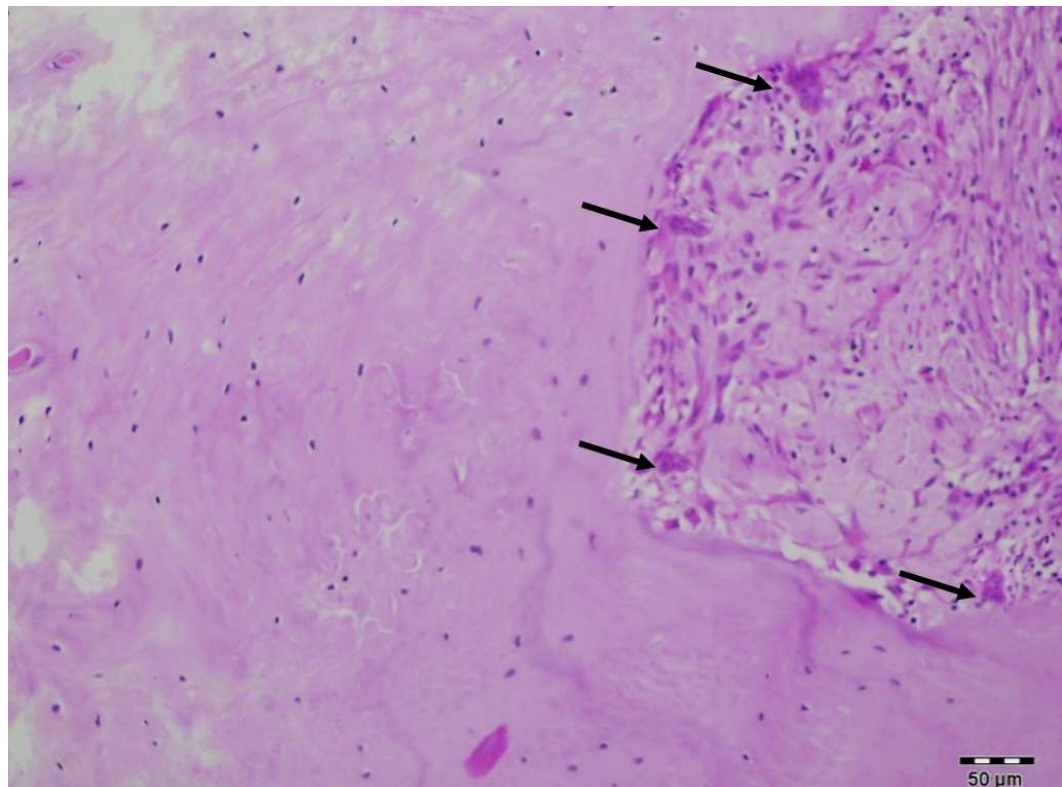


FIGURA 17 - Contagem de osteoclastos nas lâminas coradas com hematoxilina e eosina. As setas indicam os osteoclastos presentes na imagem.

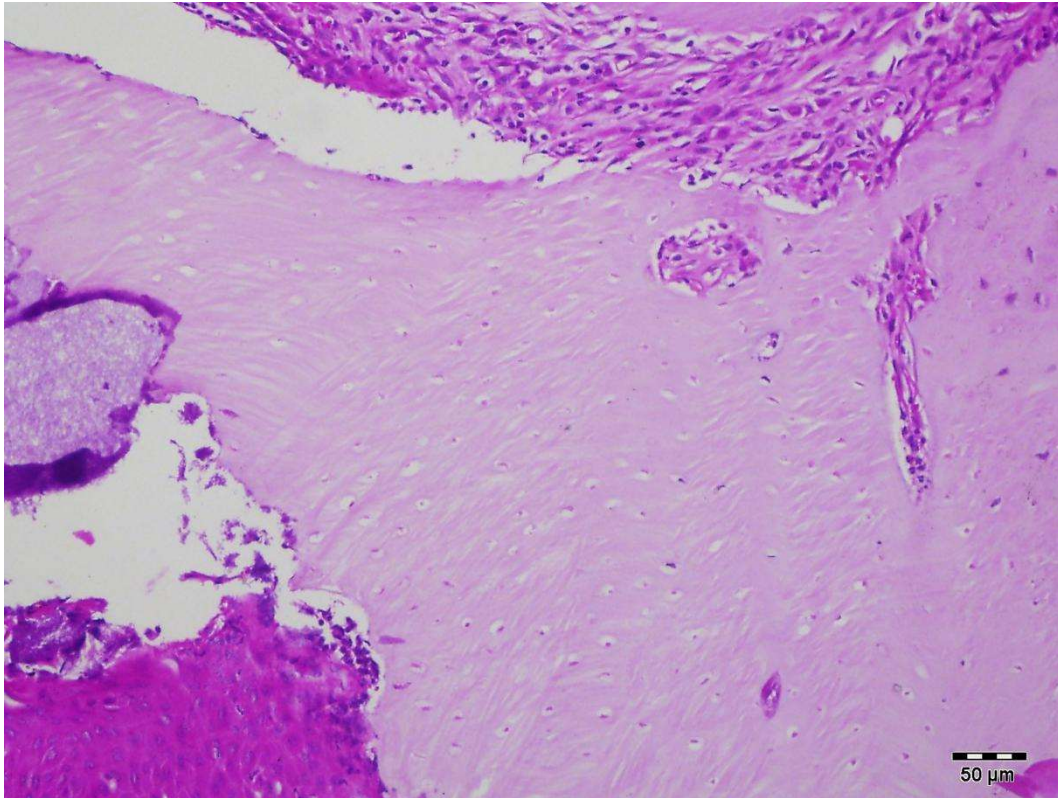


FIGURA 18 - Área de necrose óssea nas lâminas coradas com hematoxilina e eosina.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados quantitativos com distribuição normal, foi realizado o teste de análise da variância (ANOVA) de um critério comparando entre grupos, foi realizado o pós teste de Tukey. Para as análises qualitativas e para dados quantitativos onde não se obteve distribuição normal dos dados, utilizou-se o teste estatístico de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn's. Por fim, para dados qualitativos nominais dicotômicos o teste eleito foi o de exato Fisher. O nível de significância de 0,05 foi adotado ($p < 0,05$) para que as diferenças fossem consideradas significativas.

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Através da avaliação macroscópica das hemimandíbulas após dissecação, evidenciou-se a presença ou ausência de defeitos ósseos. Os grupos C e RE mantiveram suas corticais ósseas intactas, seguindo as etapas de cicatrização gradual. Enquanto o Grupo BF apresentou 90% (n=9) de defeitos ósseos, decorrentes do atraso no processo cicatricial, sendo 70%(n=7) de fenestrações e 20% (n=2) de deiscência. O grupo BF+RE também apresentou defeitos ósseos sendo 40% (n=4) de fenestrações e 10% (n=1) deiscência (TABELA 5).

Por meio do teste exato de Fisher para dados qualitativos nominais, verificou-se diferença estatística entre o grupo BF e os demais grupos para a variável fenestração ($p<0,05$) e não houve diferença estatística para a variável deiscência.

TABELA 5 - Análise macroscópica das hemimandíbulas esquerda após dissecação e desidratação.

AVALIAÇÕES MACROSCÓPICAS	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	C	BF	RE	BF+RE
FENESTRAÇÃO	0% ^A	70% ^B	0% ^A	40% ^{AB}
DEISCÊNCIA	0% ^A	20% ^A	0% ^A	10% ^A

Frequência da presença/ausência de fenestração e deiscência nas áreas das exodontias dos 1º molares inferiores nos grupos C, BF, RE e BF+RE. As letras ao lado dos resultados expressão diferença significativa entre os grupos teste exato de Fischer ($P<0,05$) A≠B.

5.2 ANÁLISE RADIOGRÁFICA QUALITATIVA

Em todos os grupos houveram fraturas de raízes, considerada uma das maiores dificuldades da técnica. Com relação a variável sequestros ósseos, o grupo BF apresentou em 70% (n=7) de suas radiografias com esta característica, enquanto o grupo BF+RE apresentou 50% (n=5) e apenas o grupo BF apresentou diferença significativa quando comparado com os grupos C e RE. Quando se analisou a cicatrização gradual, os grupos C e RE apresentaram grande semelhança, já o grupo BF+RE se assemelha com o grupo BF, porém, a diferença estatística encontra-se

entre o grupo C, RE, BF+RE e o grupo e diferenciando-se estatisticamente do grupo BF (TABELA 6).

TABELA 6 - Análise qualitativa das imagens radiográfica digitais

AVALIAÇÕES	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	C	BF	RE	BF+RE
MACROSCÓPICAS				
RAIZ RESIDUAL	30% ^A	40% ^A	40% ^A	20% ^A
SEQUESTROS ÓSSEOS	0% ^A	70% ^B	0% ^A	50% ^{AB}
CICATRIZAÇÃO GRADUAL	70% ^A	30% ^B	70% ^A	50% ^{AB}

Frequência da presença/ausência de sequestros ósseos e restos radiculares na região e avaliação da cicatrização gradual dos alvéolos nas áreas das exodontias dos 1º molares inferiores nos grupos C, BF, RE e BF+RE. As letras ao lado dos resultados expressam diferença significativa entre os grupos teste exato de Fischer ($P < 0,05$) $A \neq B$.

5.3 ANÁLISE DE DENSIDADE POR PIXEL

A médias obtidas da região alveolar (área do alvéolo excluindo sequestros ósseos e restos radiculares) após exodontia, mostraram uma diferença de densidade entre o grupo controle e os demais grupos. Os grupos RE, BF e BF+RE apresentaram um osso mais denso, ou seja, com maior radiopacidade (FIGURA 19).

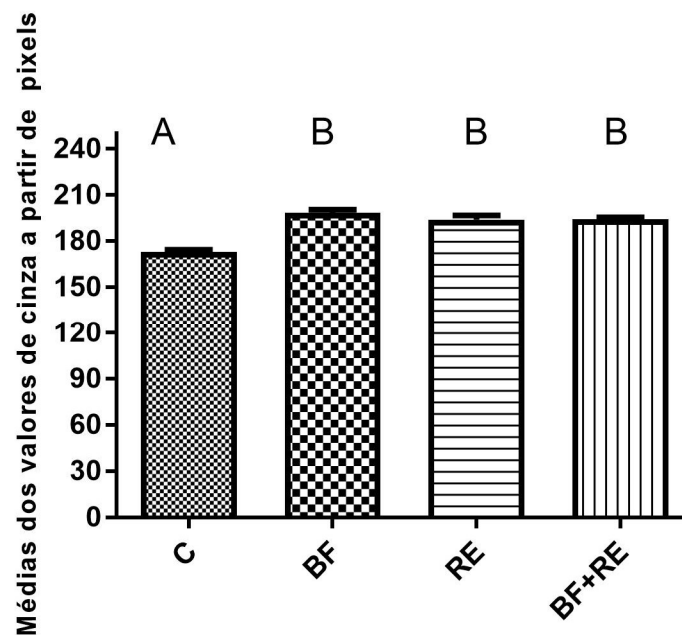


FIGURA 19 - Representação gráfica das médias da área de reparo ósseo alveolar expressas em escala de cinza (pixel), excluindo raízes residuais e sequestros ósseos. Os resultados estão expressos como média e erro padrão da média (EP) dos valores da escala de cinza (n=10). A $\neq$ B indica diferença estatística entre os grupos (ANOVA, Tukey $p < 0,05$.)

5.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Foram realizadas análises histológicas a fim de observar a presença ou ausência de necrose óssea através da porcentagem de lacunas vazias, sendo que oito lacunas adjuntas foram consideradas áreas de necrose. Outros pontos analisados foram o aumento ou a redução da celularidade (quantidade de osteócitos) na região do reparo ósseo pós exodontia, foi quantificado através do número de osteócitos por mm^2 . Outra análise que pressupõe áreas de necrose foram o aumento ou diminuição de vasos sanguíneos na região e quantidade de osteoclastos na região analisada.

Para avaliar a presença de necrose com o auxílio do programa ImageJ, calculou-se a porcentagem (%) de lacunas vazias presentes no osso alveolar excluindo a região de sequestros ósseos. Os grupos BF e BF+RE apresentaram maior número de lacunas vazias qualificando quadros de ONM. Foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (FIGURA 20).

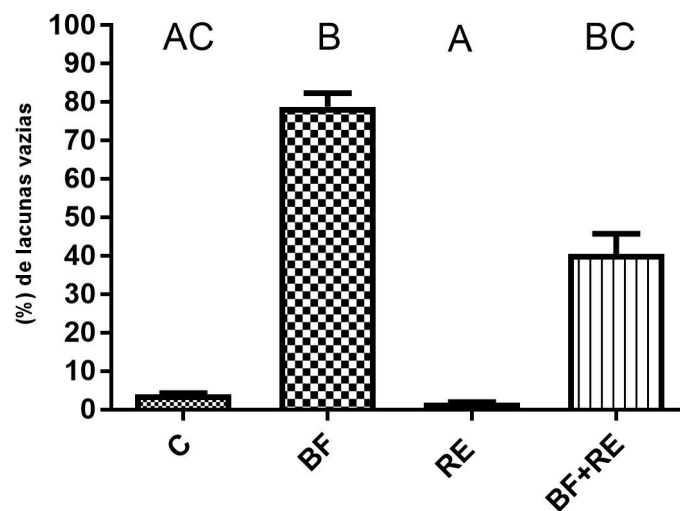


FIGURA 20 - Avaliação da % de lacunas vazias presentes no osso alveolar, excluindo sequestros ósseos. Os resultados estão expressos como média e erro padrão da média (EP) A ≠ B ≠ C indicam diferenças estatísticas entre os grupos (Kruskal-Wallis, Dunn's $p < 0,05$.)

Com relação ao número de osteócitos presentes, o resultado obtido foi que houve uma tendência ao aumento na quantidade de osteócitos no Grupo RE, porém sem diferença estatística com o grupo C. Quando comparados RE com os demais grupos, apresenta-se diferença ($P < 0,05$) na quantidade de células presentes nas regiões de reparo (FIGURA 21) (FIGURA 22).

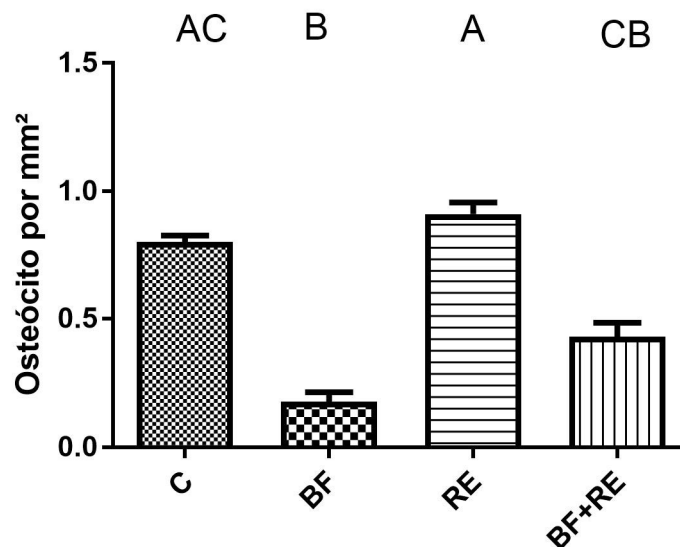


FIGURA 21 - Razão entre o número de osteócitos e a área óssea total, excluindo sequestros ósseos. (n= 10). Os resultados estão expressos com média e erro padrão da média (EP) A ≠ B ≠ C indicam diferenças estatísticas entre os grupos (Kruskal-Wallis, Dunn's $p < 0,05$.)

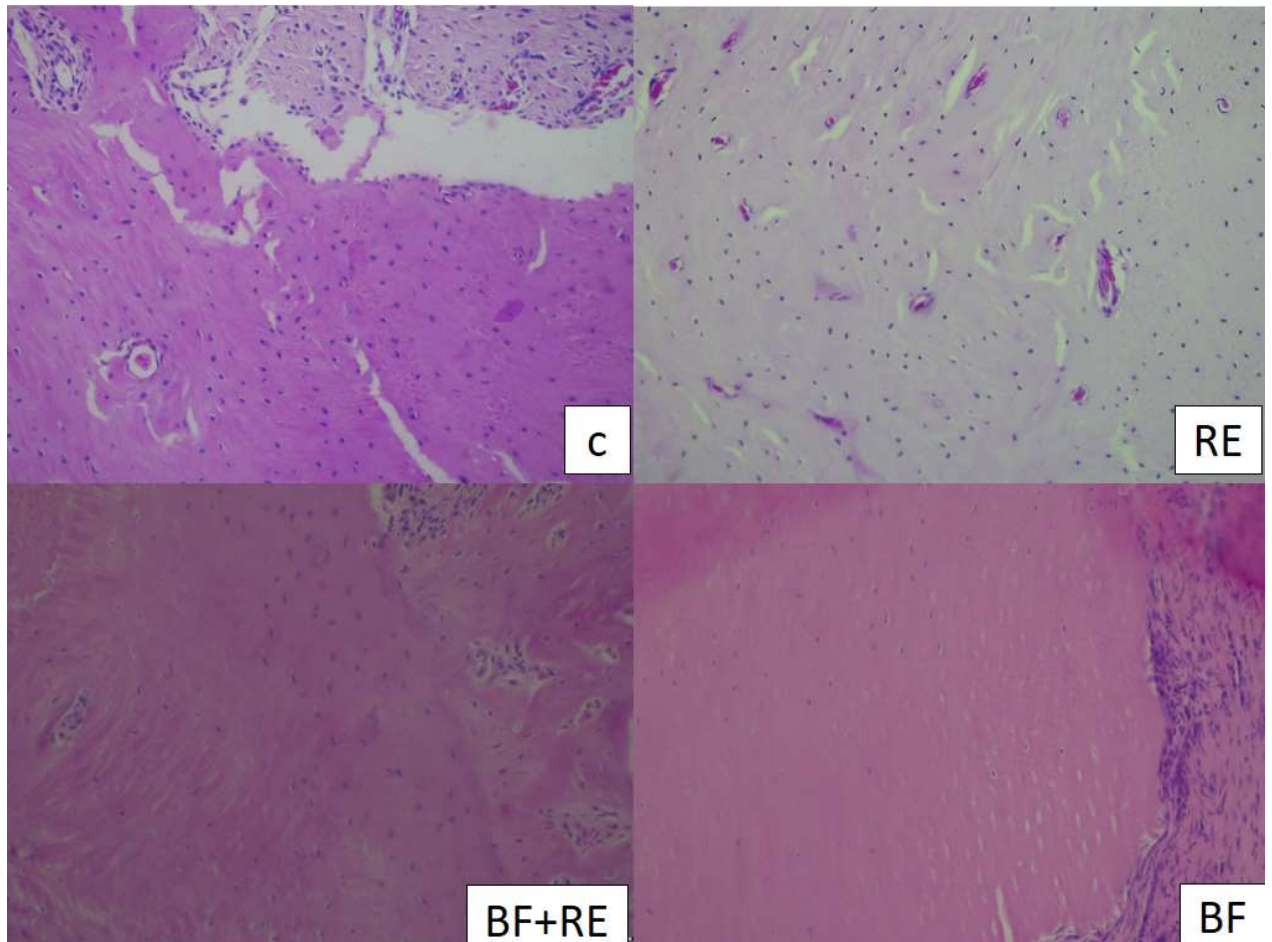


Figura 22 Comparação histológica entre os grupos, observando lacunas vazias e quantidade de osteócitos.

Com relação a presença de vasos sanguíneos na área óssea neoformada, realizou-se a contagem dos mesmos e dividiu-se pela área óssea. Houve um aumento de vasos sanguíneos no grupo RE quando comparado com os demais grupos ($p < 0,05$) (FIGURA 23) e uma redução nos grupos BF e BF+RE (FIGURA 24).

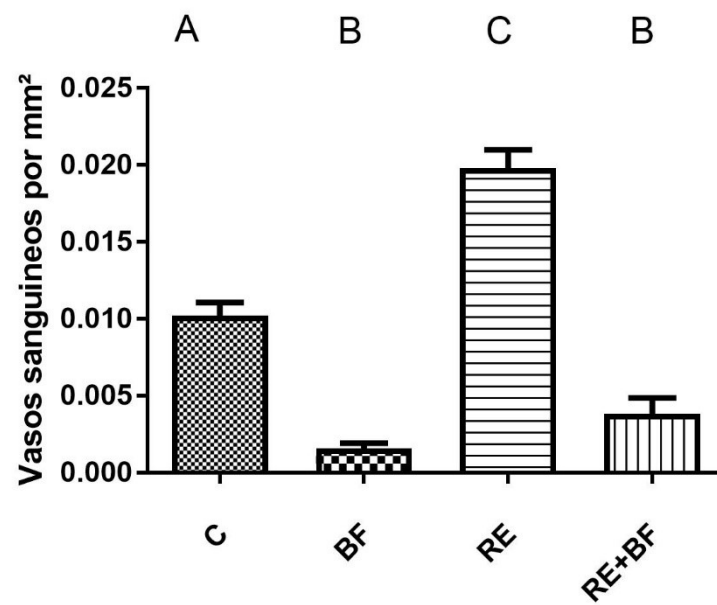


FIGURA 23 - Razão entre o número de vasos sanguíneos e a área óssea. Os resultados estão expressos com média e erro padrão da média (EP) dos vasos sanguíneos por mm² (n=10). A ≠ B ≠ C indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA, Tukey $p < 0,05$.)

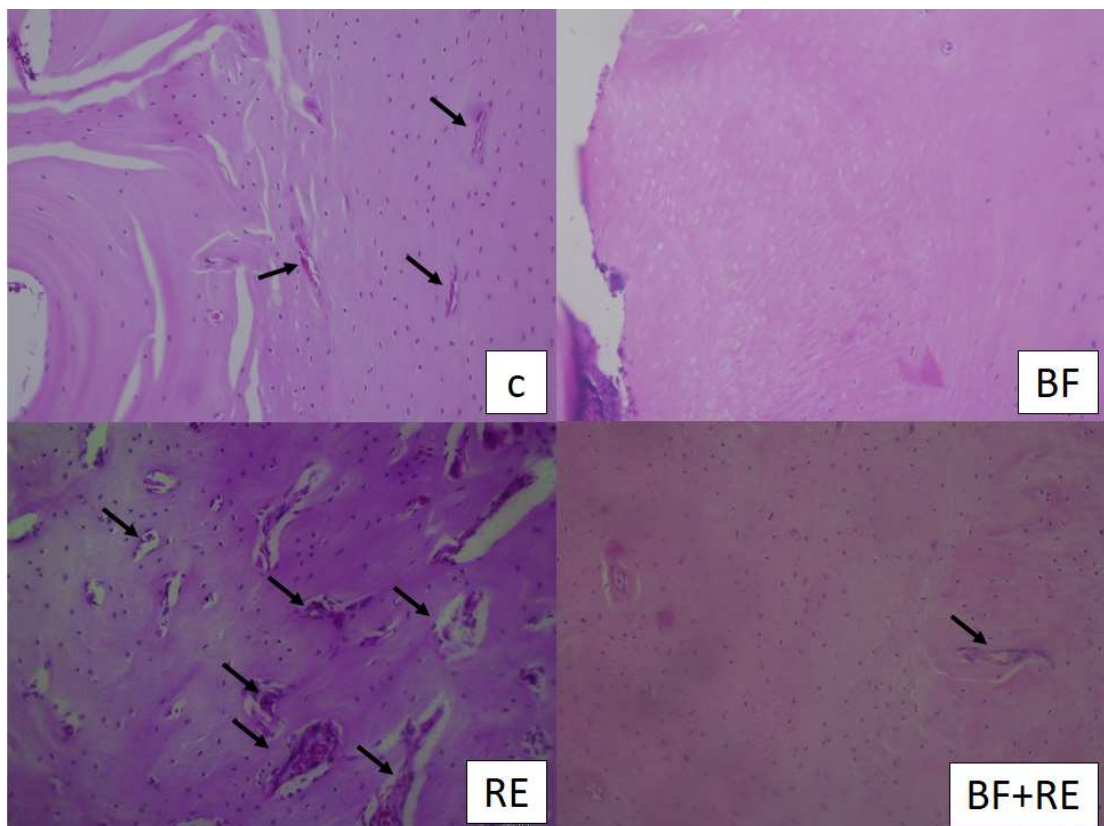


FIGURA 24- Cortes histológicos evidenciando por setas a presença de vasos sanguíneos.

Por fim nas análises histológicas realizou-se a contagem de osteoclastos presentes nos cortes histológicos. O resultado apontou um aumento no número de osteoclastos nos grupos BF e BF+RE, porém sem diferença estatística entre eles e sim com os demais grupos (FIGURA 25).

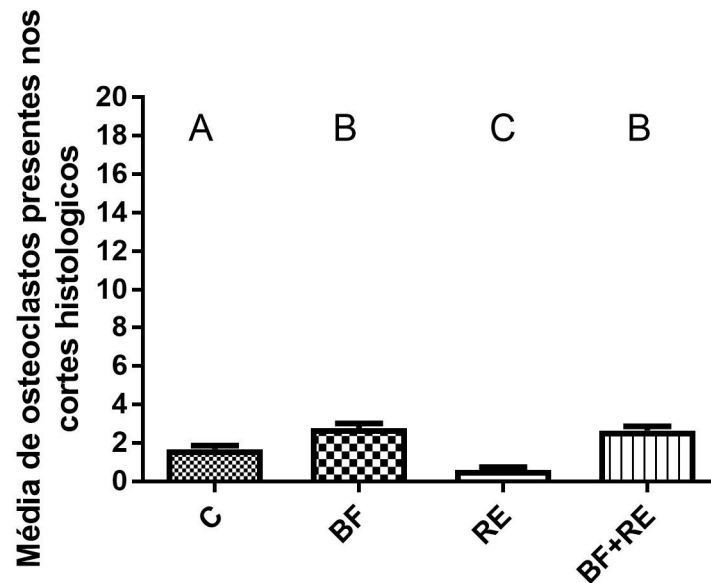


FIGURA 25 - Média do número de osteoclastos presentes nos cortes histológicos. Os resultados estão expressos com média e erro padrão da média (EP). (n =10). A $\neq$ B $\neq$ C indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA, Tukey $p < 0,05$.)

6. DISCUSSÃO

Em vista do aumento do envelhecimento da população, o consumo de medicações para combater o avanço de doenças que prejudiquem o metabolismo ósseo tem sido cada vez maior. Estas drogas devem possuir os menores efeitos colaterais possíveis, pois estes influenciam diretamente na qualidade de vida do indivíduo.

A osteonecrose, um dos possíveis efeitos colaterais do tratamento medicamentoso de doenças ósseas, já foi associada ao uso de várias drogas anti-reabsortivas como os BFs, denosumab, receptor ativador do fator nuclear- κ B (RANK-L) (QAISI et al., 2016; PETKOVA; STANIMIROV, 2017). Outros medicamentos com o potencial anti-angiogênico como bevacizumab (VAN POZNAK, 2010), também foi associado a quadros de necrose óssea. Porém não há estudos que associem o Ranelato de estrôncio a essa infecção, o que justifica a realização desta pesquisa.

Para a realização das avaliações do RE e dos quadros de necrose óssea, optou-se por ratos como modelo animal, visto que frequentemente tem sido utilizado como modelo experimental em pesquisas científicas e possibilitam uma avaliação completa do tecido ósseo (arquitetura, resistência e massa óssea) o que não é possível com relação a seres humanos em estudos clínicos (MOSEKILDE, 1995). Outros pontos levantados foram a facilidade de manutenção, replicabilidade, obtenção e baixo custo quando comparado a outros animais (MOSEKILDE, DANIELSEN e KNUDSEN, 1993). Além disso, o modelo animal escolhido possibilita aplicar em um menor tempo doses necessárias para a indução da ONM (CÓRDOVA et al, 2016).

Quanto ao tempo de vida para o início do experimento, optou-se por animais de 90 dias, visto que nesta idade observa-se o alto grau de remodelação óssea semelhante à dos humanos adultos, sendo indicado como modelo ideal de osteoporose (KALU, 1991). Frost e Jee, (1992) em seus estudos, demonstraram que a ovariectomia acarreta perda de osso trabecular da tíbia e vértebra devido à deficiência estrogênica. O mecanismo que justifica esta perda na arquitetura óssea é baseada no desequilíbrio da remodelação óssea, com a reabsorção excedendo a formação óssea, características encontradas em quadros de osteoporose (FENG; MCDONALD, 2011). Este modelo foi replicado por (KURTH et al., 2005; WANG; MCCAULEY, 2016).

O período de aplicação do AZ e eutanásia foi baseado no estudo de YANIK et al. (2016) que obteve 100% de ONM, porém optou-se por não utilizar imunossuppressores, seguindo o protocolo de Keskinruzgar et al. (2016), pois estes poderiam vir a comprometer a saúde dos animais e levar a redução no “n” amostral.

A exodontia foi o trauma de eleição para a indução de ONM, com o objetivo de um modelo de defeito ósseo que tenha características semelhantes ao reparo ósseo do complexo buco-maxilo-facial. Nesse sentido, os alvéolos dentais pós exodontias tem sido um modelo de estudo bastante utilizado para avaliação de fatores que possam acelerar ou retardar o processo de reparo ósseo (TEÓFILO; BRENTAGANI; LAMANO-CARVALHO, 2004). Um dos problemas encontrados no transcorrer da pesquisa foi com relação ao número de raízes fraturadas durante o procedimento cirúrgico, dificuldade também descrita por (SILVA et al., 2015). Pode-se dizer então que apesar da presença de raízes residuais, pode-se realizar todas as análises propostas.

Com relação a análise macroscópica, o grupo BF apresentava sinais de osteonecrose com a presença de fenestrações, como resultado de possíveis trajetos fistulares, e deiscência, o que mostra que os métodos utilizados para a indução de necrose foram eficazes. Já os grupos C e RE apresentaram um padrão de cicatrização gradual, sem defeitos ósseos presentes.

Quando comparados qualitativamente, as radiografias do grupo BF e BF+RE apresentaram quadros de sequestros ósseos, também considerados indícios de necrose do tecido ósseo (JABBOUR et al., 2014). Já os grupos C e RE apresentaram um padrão de cicatrização gradual, sem a presença de necrose, como Bain et al (2009) através de seu experimento encontrou, sinais de prevenção na perda óssea e na deterioração da microarquitetura óssea. Em relação à reparação óssea, Brüel et al (2011) demonstrou que o RE estimula a formação do calo ósseo nos períodos iniciais na reparação, enquanto nesta pesquisa o grupo RE apesar da tendência ao aumento de osteócitos, não obteve diferença significativa com o grupo controle.

Ao se analisar a densidade por pixel excluindo os sequestros ósseos, os grupos RE, BF e BF+RE obtiveram semelhança, e diferença estatística com grupo C. Os três grupos apresentavam um processo de reparo mais radiopaco, com maior densidade, que no grupo RE mostrou-se benéfico, assim como Li et al (2011) demonstrou que o

tratamento com RE otimiza a osteointegração de implantes, pois esse tratamento proporcionou aumento da densidade óssea na região do implante e aumento na área de contato com implante. Já nos grupos BF e BF+RE sua densidade não foi considerada benéfica (SILVA et al., 2015; JANG; KIM; CHA, 2015), pois quando analisados histologicamente ambos apresentavam necrose óssea.

Quando comparado histologicamente, o grupo RE obteve um ligeiro aumento na quantidade de osteócitos presentes por milímetro quadrado, porém sem diferença estatística com o grupo C. Bakker, Zandieh-Doulabi e Klein-Nulend (2013) afirmam os benefícios do aumento do número de osteócitos para reduzir fraturas, ou seja, para a manutenção de uma microarquitetura forte e saudável. O autor ainda afirma que RE alterou a comunicação dos osteócitos estimulados mecanicamente para osteoblastos e osteoclastos e conclui afirmando que a força do RE no tecido ósseo pode ser parcialmente explicada por uma modulação biológica dos osteócitos. O grupo BF+RE não apresentou diferença com o grupo C, porém apresentou quadros de necrose óssea. O grupo BF apresentou grande quantidade de lacunas vazias adjuntas, que são consideradas características de áreas de necrose (HOWIE et al., 2015, YANIK et al., 2016).

Ao se analisar vasos sanguíneos, o grupo RE mostrou um significativo aumento, principalmente de capilares de menor calibre, quando comparado aos demais grupos, o que corrobora com Gu et al. (2014) que em seu estudo com materiais enriquecidos com estrôncio, mostrou uma melhora na expressão de VEGF, afirmando assim que drogas com este mineral em sua composição aumentam o potencial antigênico. Este achado explica porque o Ranelato de estrôncio é um medicamento indicado para o tratamento de osteoporose, mas não para o tratamento de metástases ósseas e câncer. O aumento de vasos sanguíneos não ocorreu no grupo BF e BF+RE, Gao et al. (2017) em seu trabalho, afirmou que o AZ reduz a angiogênese e osteogênese através da sinalização PDGF-BB-PDGFR- β , mecanismos importantes para remodelação óssea, que pode contribuir diretamente para a patogênese da ONM.

Houve semelhança estatística nos grupos BF+RE e BF, quando realizou-se a contagem de osteoclastos. No grupo BF, os resultados encontrados nesta pesquisa são opostos aos descritos por Kimachi et al. (2011), que observou o AZ causando

uma inibição da osteoclastogênese. Porém Córdova et al. (2016) encontrou resultados que vão de acordo com os apresentados e ainda explica que as células apesar de em maior quantidade, apresentavam uma clara modificação na morfologia celular. Já o grupo RE, apresentou uma redução na quantidade de osteoclastos. Esta redução foi observada por Bakker, Zandieh-doulabi e Klein-nulend (2013) que também descreveu em seus achados uma supressão da formação de osteoclastos na presença de meio condicionado de RE. Segundo estes estudos, há um forte efeito inibitório dos osteócitos na osteoclastogênese, sugerindo que os osteócitos tratados com RE produzem fatores solúveis que inibem estes eventos.

Apesar das limitações deste estudo, pode-se obter um modelo animal de indução de osteonecrose associada ao uso de Bifosfonatos, confiável e reproduzível. Esta droga, solução para condições patológicas cujo foco é a reabsorção óssea, traz como efeito colateral a osteonecrose, visto sua atuação direta na homeostase do tecido ósseo. Novos estudos precisam ser realizados para a compreensão dos mecanismos de ação do ranelato de estrôncio visto que de acordo com os resultados deste estudo ele não causa ONM. Então nos casos em que o paciente tenha pré-disposição a esta doença, o RE pode ser uma opção de droga para o tratamento de alguns distúrbios ósseos.

7. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados mostram que o RE não causa quadro de osteonecrose nos maxilares. Este medicamento apresenta uma tendência ao aumento de osteócitos, e um aumento de vasos sanguíneos. Além disso reduz a quantidade de osteoclastos. Com relação ao uso de RE de forma profilática, como uma maneira de prevenir quadros de necrose óssea, este mostrou que apesar da redução de alguns pontos do quadro de ONM, ainda se apresenta ineficaz para o tratamento da doença, o que pode-se pressupor que o AZ é um fármaco mais potente do que o RE, e suas características sobrepõe-se ao fármaco teste.

8. REFERÊNCIAS

1. ALMĂȘAN, H.A. et al. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates. Discussion over 52 cases. **Romanian Journal of Morphology & Embryology** v. 52, n.4, p. 1233-1241, nov. 2011.
2. AMMANN, P. et al. Strontium Ranelate Improves Bone Resistance by Increasing Bone Mass and Improving Architecture in Intact Female Rats. **Journal Of Bone And Mineral Research**, [s.l.], v. 19, n. 12, p.2012-2020, set. 2004.
3. ARANTES, H. P.; SILVA, A. G. d.; LAZARETTI-CASTRO, M.. Bisphosphonates in the treatment of metabolic bone diseases. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [s.l.], v. 54, n. 2, p.206-212, mar. 2010.
4. ARCE, K. et al. Imaging Findings in Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of Jaws. **Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery**, [s.l.], v. 67, n. 5, p.75-84, mai. 2009.
5. BAIN, S. D. et al. Strontium ranelate improves bone strength in ovariectomized rat by positively influencing bone resistance determinants. **Osteoporosis International**, [s.l.], v. 20, n. 8, p.1417-1428, 20 ago. 2009.
6. BAKKER, A. D.; ZANDIEH-DOULABI, B.; KLEIN-NULEND, J.. Strontium Ranelate affects signaling from mechanically-stimulated osteocytes towards osteoclasts and osteoblasts. **Bone**, [s.l.], v. 53, n. 1, p.112-119, mar. 2013.
7. BARASCH, A. et al. Risk Factors for Osteonecrosis of the Jaws. **Journal Of Dental Research**, [s.l.], v. 90, n. 4, p.439-444, fev. 2011.
8. BARON, R.; FERRARI, S.; RUSSELL, R. G. G. Denosumab and bisphosphonates: Different mechanisms of action and effects. **Bone**, [s.l.], v. 48, n. 4, p.677-692, abr. 2011.
9. BARONCELLI, G. I.; BERTELLONI, S.. The Use of Bisphosphonates in Pediatrics. **Hormone Research In Paediatrics**, [s.l.], v. 82, n. 5, p.290-302, nov. 2014.
10. BENLIDAYI, L. C.; GUZEL, R. Oral Bisphosphonate Related Osteonecrosis of the Jaw: A Challenging Adverse Effect. **Isrn Rheumatology**, [s.l.], v. 2013, n.16 p.1-6, mai. 2013.
11. BENLIDAYI, L. C.; GUZEL, R.. Oral Bisphosphonate Related Osteonecrosis of the Jaw: A Challenging Adverse Effect. **Isrn Rheumatology**, [s.l.], v. 2013, n - p.1-6, mai. 2013.
12. BLAKE, G. M; FOGELMAN, I. Strontium ranelate: a novel treatment for postmenopausal osteoporosis: a review of safety and efficacy: a review of safety and efficacy. **Clinical Interventions In Aging**, [s. L.], v. 4, n. 1, p.367-375, dez. 2006.

13. BOCK, O.; FELSENBURG, D. Bisphosphonates in the management of postmenopausal osteoporosis – optimizing efficacy in clinical practice. **Clinical Interventions In Aging**, [s. l.], v. 2, n. 3, p.279-297, jun. 2008.
14. BONNELYE, Edith et al. Dual effect of strontium ranelate: Stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. **Bone**, [s.l.], v. 42, n. 1, p.129-138, jan. 2008
15. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Eficácia e Segurança do uso dos Bisfosfonato por longo prazo para prevenção de fraturas osteoporóticas em mulheres na menopausa. **Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde**. Ano VII, nº21, 2013.
16. BRENNAN, T.C. et al. Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 157, n. 7, p.1291-1300, ago. 2009.
17. BRÜEL, A. et al. Strontium Is Incorporated into the Fracture Callus but Does Not Influence the Mechanical Strength of Healing Rat Fractures. **Calcified Tissue International**, [s.l.], v. 88, n. 2, p.142-152, fev. 2011
18. CAMPISI, G. et al. Epidemiology, clinical manifestations, risk reduction and treatment strategies of jaw osteonecrosis in cancer patients exposed to antiresorptive agents. **Future Oncology**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.257-275, fev. 2014.
19. CANALIS, E.. New Treatment Modalities in Osteoporosis. **Endocrine Practice**, [s.l.], v. 16, n. 5, p.855-863, set. 2010.
20. CATTALINI, J. P. et al. Bisphosphonate-Based Strategies for Bone Tissue Engineering and Orthopedic Implants. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, [s.l.], v. 18, n. 5, p.323-340, out. 2012.
21. CIANFEROTTI, L.; D'ASTA, F.; BRANDI, M. L.. A review on strontium ranelate long-term antifracture efficacy in the treatment of postmenopausal osteoporosis. **Therapeutic Advances In Musculoskeletal Disease**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.127-139, mai. 2013.
22. CÓRDOVA, L. A. et al. Severe compromise of preosteoblasts in a surgical mouse model of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. **Journal Of Cranio-maxillofacial Surgery**, [s.l.], v. 44, n. 9, p.1387-1394, set. 2016.
23. CROCKETT, J.; DAS. Osteoporosis – a current view of pharmacological prevention and treatment. **Drug Design, Development And Therapy**, [s.l.], v.7 n-p.435-448, mai 2013.
24. DINIZ-FREITAS, M. et al. Oral bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: Clinical characteristics of a series of 20 cases in Spain. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugia Bucal**, [s.l.], v. 17 n. 5 p.751-758, 2012.

25. DRAKE, M. T.; CLARKE, B. L.; KHOSLA, S.. Bisphosphonates: Mechanism of Action and Role in Clinical Practice. **Mayo Clinic Proceedings**, [s.l.], v. 83, n. 9, p.1032-1045, set. 2008.
26. EBETINO, F. H. et al. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. **Bone**, [s.l.], v. 49, n. 1, p.20-33, jul. 2011.
27. ERIKSEN, E. F.. Treatment of osteopenia. **Reviews In Endocrine And Metabolic Disorders**, [s.l.], v. 13, n. 3, p.209-223, jun. 2011.
28. FENG, X.; MCDONALD, J. M.. Disorders of Bone Remodeling. **Annual Review Of Pathology: Mechanisms of Disease**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.121-145, fev. 2011.
29. FROMIGUÉ, O. et al. Calcium sensing receptor-dependent and receptor-independent activation of osteoblast replication and survival by strontium ranelate. *Journal Of Cellular And Molecular Medicine*, [s.l.], v. 13, n. 8, p.2189-2199, ago. 2009.
30. FROST, H. M.; JEE, W. S. S.; On the rat model of human osteopenias and osteoporosis. **Bone and Mineral**, v. 18, n. 3 p. 227-236, set. 1992.
31. FROST, H.M. Defining osteopenia and osteoporosis: another view (with insights from a new paradigm). **Bone**, v.20, n.5, p.385-391 mai. 1997.
32. GAO, S. et al. Zoledronate suppressed angiogenesis and osteogenesis by inhibiting osteoclasts formation and secretion of PDGF-BB. **Plos One**, [s.l.], v. 12, n. 6, p.1-15, jun. 2017.
33. GLEZERMAN, I. G.; STERNLICHT, H.. Hypercalcemia of malignancy and new treatment options. **Therapeutics And Clinical Risk Management**, [s.l.], p.1779-1788, v. 2015 n. 11, dez. 2015.
34. GU, Z. et al. Effects of strontium-doped calcium polyphosphate on angiogenic growth factors expression of co-culturing system in vitro and of host cell in vivo. **RSC Advances**, [s.l.], v. 4, n. 6, p.2783-2792, out. 2014.
35. HOWIE, R. N. et al. A Model for Osteonecrosis of the Jaw with Zoledronate Treatment following Repeated Major Trauma. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 7, p.1-16, jul. 2015.
36. HUTAGALUNG, A. H.; NOVICK, P. J.. Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology. **Physiological Reviews**, [s.l.], v. 91, n. 1, p.119-149, jan. 2011.
37. HUTCHINSON, M. et al. Radiographic Findings in Bisphosphonate-Treated Patients With Stage 0 Disease in the Absence of Bone Exposure. **Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery**, [s.l.], v. 68, n. 9, p.2232-2240, set. 2010.
38. JABBOUR, Z et al. Bisphosphonates inhibit bone remodeling in the jaw bones of rats and delay healing following tooth extractions. **Oral Oncology**, [s.l.], v. 50, n. 5, p.485-490, mai. 2014.

39. JANG, H.; KIM, J.; CHA, I.. Development of animal model for Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). **Maxillofacial Plastic And Reconstructive Surgery**, [s.l.], v. 37, n. 1, p.1-7, 25 jul. 2015.
40. KALU, D.N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone and Mineral**, v.15, n.3, p.175-192. Dez. 1991.
41. KESKINRUZGAR, A. et al. Histopathological Effects of Teriparatide in Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: An Animal Study. **Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery**, [s.l.], v. 74, n. 1, p.68-78, jan. 2016.
42. KHAJURIA, D. K.; RAZDAN, R.; MAHAPATRA, D. R.. Medicamentos para o tratamento da osteoporose: revisão. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [s.l.], v. 51, n. 4, p.372-382, ago. 2011.
43. KHOSLA, S. et al. Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw: Report of a Task Force of the American Society for Bone and Mineral Research. **Journal Of Bone And Mineral Research**, [s.l.], v. 22, n. 10, p.1479-1491, jul. 2007.
44. KIMACHI, K. et al. Zoledronic acid inhibits RANK expression and migration of osteoclast precursors during osteoclastogenesis. **Naunyn-schmiedeberg's Archives Of Pharmacology**, [s.l.], v. 383, n. 3, p.297-308, jan. 2011.
45. KOBAYASHI, Y. et al. Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice. **Journal Of Bone And Mineral Metabolism**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.165-175, out. 2009.
46. KROCK, B. L.; SKULI, N.; SIMON, M. C.. Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and Evil. **Genes & Cancer**, [s.l.], v. 2, n. 12, p.1117-1133, set. 2011.
47. KURTH, A.H.A. et al. The bisphosphonate ibandronate improves implant integration in osteopenic ovariectomized rats. **Bone**, [s.l.], v. 37, n. 2, p.204-210, ago. 2005.
48. LAZAROVICI, T. S. et al. Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws: A Single-Center Study of 101 Patients. **Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery**, [s.l.], v. 67, n. 4, p.850-855, abr. 2009.
49. LI, Y. et al. Effects of strontium ranelate on osseointegration of titanium implant in osteoporotic rats. **Clinical Oral Implants Research**, [s.l.], v. 23, n. 9, p.1038-1044, nov. 2011.
50. LLINAS, Paola et al. Structural studies of human alkaline phosphatase in complex with strontium: Implication for its secondary effect in bones. **Protein Science**, [s.l.], v. 15, n. 7, p.1691-1700, jul. 2006.
51. LÓPEZ-JORNET, P. et al. An experimental study of bisphosphonate-induced jaws osteonecrosis in Sprague-Dawley rats. **Journal Of Oral Pathology & Medicine**, [s.l.], v. 39, n. 9, p.697-702, ago. 2010.

52. MAAHS, M. P. et al. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats: Secondary Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats. **Head Neck**, [s.l.], v. 33, n. 2, p. 199-207, fev. 2011.
53. MAJOR, P. et al. Zoledronic Acid Is Superior to Pamidronate in the Treatment of Hypercalcemia of Malignancy: A Pooled Analysis of Two Randomized, Controlled Clinical Trials. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 19, n. 2, p.558-567, jan. 2001.
54. MARIE, P. J.. Strontium ranelate: a novel mode of action optimizing bone formation and resorption. **Osteoporosis International**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.7-10, dez. 2005.
55. MARIE, P. J.; FELSEBERG, D.; BRANDI, M. L.. How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents osteoporosis. **Osteoporosis International**, [s.l.], v. 22, n. 6, p.1659-1667, set. 2010.
56. MARX, R. E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery**, [s.l.], v. 61, n. 9, p.1115-1117, set. 2003.
57. MEUNIER, Pierre J. et al. The Effects of Strontium Ranelate on the Risk of Vertebral Fracture in Women with Postmenopausal Osteoporosis. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 350, n. 5, p.459-468, jan. 2004.
58. MIGLIORATI, C. A. et al. A systematic review of bisphosphonate osteonecrosis (BON) in cancer. **Supportive Care In Cancer**, [s.l.], v. 18, n. 8, p.1099-1106, abr. 2010.
59. MILLER, P. D. et al. Renal safety in patients treated with bisphosphonates for osteoporosis: A review. **Journal Of Bone And Mineral Research**, [s.l.], v. 28, n. 10, p.2049-2059, set. 2013.
60. MORAG, Y. et al. Bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Jaw: A Pictorial Review. **Radiographics**, [s.l.], v. 29, n. 7, p.1971-1984, nov. 2009.
61. MORDEN, N. E. et al. Oral bisphosphonates and upper gastrointestinal toxicity: a study of cancer and early signals of esophageal injury. **Osteoporosis International**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.663-672, out. 2014.
62. MOSEKILDE, L. Assessing bone quality — Animal models in preclinical osteoporosis research. **Bone**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.343-352, out. 1995.
63. MOSEKILDE, L.; DANIELSEN, C.c.; KNUDSEN, U.b.. The effect of aging and ovariectomy on the vertebral bone mass and biomechanical properties of mature rats. **Bone**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.1-6, jan. 1993.
64. MOTTAGHI, P. Intravenous bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis. **The Official Journal Of Isfahan University Of Medical Sciences**, [s.l.], v. 3, n. 15, p.175-184, jun. 2010.

65. NOMURA, T. et al. Bisphosphonate-related Osteonecrosis of Jaw (BRONJ) in Japanese Population: A Case Series of 13 Patients at Our Clinic. **The Bulletin Of Tokyo Dental College**, [s.l.], v. 54, n. 2, p.117-125, fev. 2013.
66. NORTON, J. T. et al. Cutting Edge: Nitrogen Bisphosphonate-Induced Inflammation Is Dependent upon Mast Cells and IL-1. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 188, n. 7, p.2977-2980, mar. 2012.
67. OLIVEIRA, Cc de et al. Osteonecrosis of the jaw induced by receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (Denosumab) - Review. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugia Bucal**, [s.l.], v. 21, n.4 p.431-439, jul. 2016.
68. OLIVEIRA, J. P. et al. Strontium Is Incorporated in Different Levels into Bones and Teeth of Rats Treated with Strontium Ranelate. **Calcified Tissue International**, [s.l.], v. 91, n. 3, p.186-195, 18 jul. 2012.
69. OR, C. et al. Pro-inflammatory and anti-angiogenic effects of bisphosphonates on human cultured retinal pigment epithelial cells. **British Journal Of Ophthalmology**, [s.l.], v. 97, n. 8, p.1074-1078, jun. 2013.
70. ORTOLANI, S.; VAI, S.. Strontium ranelate: An increased bone quality leading to vertebral antifracture efficacy at all stages. **Bone**, [s.l.], v. 38, n. 2, p.19-22, fev. 2006.
71. PACHECO, V. N. et al. Nitrogen-containing bisphosphonate therapy: assessment of the alveolar bone structure in rats—a blind randomized controlled trial. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 96, n. 4, p. 255-260, Jun. 2015.
72. PETKOVA, M.; STANIMIROV, P. Denosumab Related Osteonecrosis of the Jaw with Spontaneous Necrosis of the Soft Palate: Report of a Life Threatening Case. **Journal Of Imab - Annual Proceeding (scientific Papers)**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.1483-1486, mar. 2017.
73. PILMANE, M. et al. Strontium and strontium ranelate: Historical review of some of their functions. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 78, n- p.1222-1230, set. 2017.
74. QAISI, M. et al. Denosumab Related Osteonecrosis of the Jaw with Spontaneous Necrosis of the Soft Palate: Report of a Life Threatening Case. **Case Reports In Dentistry**, [s.l.], v. 2016, n- p.1-6, ago. 2016.
75. RASMUSSEN, L.; ABTAHI, J. Bisphosphonate Associated Osteonecrosis of the Jaw: An Update on Pathophysiology, Risk Factors, and Treatment. **International Journal Of Dentistry**, [s.l.], v. 2014, n- p.1-9, mai. 2014.
76. REAGAN-SHAW, S., NIHAL, M., AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The Faseb Journal**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.659-661, out. 2007.
77. REGINSTER, J. Y. et al. The position of strontium ranelate in today's management of osteoporosis. **Osteoporosis International**, [s.l.], v. 26, n. 6, p.1667-1671, abr. 2015.

78. RODAN, G; A FLEISCH, H. Bisphosphonates: mechanisms of action. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 97, n. 12, p.2692-2696 jun. 1996.
79. ROGERS, M. J. et al. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Bone**, [s.l.], v. 49, n. 1, p.34-41, jul. 2011.
80. RODRIGUEZ-LOZANO, F. J.; OÑATE-SANCHEZ, R.E. Treatment of osteonecrosis of the jaw related to bisphosphonates and other antiresorptive agents. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, [s.l.], v. 21 n.5 p.595-600, set, 2016.
81. RUGANI, P. et al. Stage-related treatment concept of medication-related osteonecrosis of the jaw—a case series. **Clinical Oral Investigations**, [s.l.], v. 19, n. 6, p.1329-1338, 17 dez. 2014.
82. RUGGIERO, S L. et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws—2009 Update. **Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery**, [s.l.], v. 67, n. 5, p.2-12, maio 2009.
83. RUGGIERO, S. L. et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw. **Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery**, [s.l.], v. 72, n. 10, p.1938-1956, out. 2014.
84. RUGGIERO, S. L.; FANTASIA, J.; CARLSON, E.. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, And Endodontology**, [s.l.], v. 102, n. 4, p.433-441, out. 2006.
85. RUPEL, K. et al. A systematic review of therapeutical approaches in bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). **Oral Oncology**, [s.l.], v. 50, n. 11, p.1049-1057, nov. 2014.
86. RUSSELL, R. G. G. Bisphosphonates: The first 40years. **Bone**, [s.l.], v. 49, n. 1, p.2-19, jul. 2011.
87. SATO, M et al. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 88, n. 6, p.2095-2105, dez. 1991.
88. SETON, M.; KRANE, S. M. Use of zoledronic acid in the treatment of Paget's disease. **Therapeutics And Clinical Risk Management**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.913-918, out. 2007.
89. SILVA, P. G. B. et al. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. **Archives Of Oral Biology**, [s.l.], v. 60, n. 9, p.1237-1245, set. 2015.
90. SILVERMAN, S. L.; LANDESBURG, R. Osteonecrosis of the Jaw and the Role of Bisphosphonates: A Critical Review. The American **Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 122, n. 2, p.33-45, fev. 2009.

91. SKREPNEK, G. H. et al. Adverse events and intravenous versus oral bisphosphonate use in patients with osteoporosis and cancer in the U.S. **General Dentistry**, [s. l.], v. 6, n. 58, p.484-492, dez. 2010.
92. SOZEN, T.; OZISIK, L.; BASARAN, N. C.. An overview and management of osteoporosis. **European Journal Of Rheumatology**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.46-56, mar. 2017.
93. SUZUKI, K. et al. Current Topics in Pharmacological Research on Bone Metabolism: Inhibitory Effects of Bisphosphonates on the Differentiation and Activity of Osteoclasts. **Journal Of Pharmacological Sciences**, [s.l.], v. 100, n. 3, p.189-194, mar. 2006.
94. SZALAY A. E. Bisphosphonate use in children with pediatric osteoporosis and other bone conditions. **Journal Of Pediatric Rehabilitation Medicine: An Inderdisciplinary Approach**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.125-132, mar. 2014.
95. TAN, S. et al. Deregulation of Bone Forming Cells in Bone Diseases and Anabolic Effects of Strontium-Containing Agents and Biomaterials. **Biomed Research International**, [s.l.], v.1, n 4 p.1-12, mar. 2014.
96. TENORE, G. et al. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws (MRONJ): Etiological Update. **Senses And Sciences**, [s.l.], v. 4 n. 1, p.147-152, dez. 2014.
97. TEÓFILO, J. M.; BRENTGANI, L. G.; LAMANO-CARVALHO, T. L. Bone healing in osteoporotic female rats following intra-alveolar grafting of bioactive glass. **Archives Of Oral Biology**, [s.l.], v. 49, n. 9, p.755-762, set. 2004
98. TSAO, C. et al. Oral Health Risk Factors for Bisphosphonate-Associated Jaw Osteonecrosis. **Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery**, [s.l.], v. 71, n. 8, p.1360-1366, ago. 2013.
99. VAN BEEK, E.R.; LÖWIK, C.W.G.M.; PAPAPOULOS, S.E. Bisphosphonates suppress bone resorption by a direct effect on early osteoclast precursors without affecting the osteoclastogenic capacity of osteogenic cells: the role of protein geranylgeranylation in the action of nitrogencontaining bisphosphonates on osteoclast precursors. **Bone**, [s.l.], v. 30, n. 1, p.64-70, jan. 2002.
100. VAN POZNAK, C. Osteonecrosis of the jaw and bevacizumab therapy. **Breast Cancer Research And Treatment**, [s.l.], v. 122, n. 1, p.189-191, mai. 2010.
101. WANG, C.; MCCAULEY, L. K.. Osteoporosis and Periodontitis. **Current Osteoporosis Reports**, [s.l.], v. 14, n. 6, p.284-291, 30 set. 2016.
102. WOOD, J. Novel Antiangiogenic Effects of the Bisphosphonate Compound Zoledronic Acid. **Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, [s.l.], v. 302, n. 3, p.1055-1061, set. 2002.
103. YAMASHITA, J.; MCCAULEY, L. K. Antiresorptives and Osteonecrosis of the Jaw. **Journal Of Evidence Based Dental Practice**, [s.l.], v. 12, n. 3, p.233-247, set. 2012.

104. YANIK, S. et al. Histopathological features of bisphosphonates related osteonecrosis of the jaw in rats with and without vitamin d supplementation. **Archives Of Oral Biology**, [s.l.], v. 65, n.- p.59-65, mai. 2016.
105. ZANDI, M. et al. Perioperative discontinuation of intravenous bisphosphonate therapy reduces the incidence and severity of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: A randomized, controlled, prospective experimental study in rats. **Journal Of Cranio-maxillofacial Surgery**, [s.l.], v. 43, n. 9, p.1823-1828, nov. 2015.
106. ZARROW, X., **Experimental Endocrinology: a sourcebook of basic techniques**. Academic Press, New York, 137 p. 1964.
107. ZHOU, Z. et al. Alendronate Prevents Intervertebral Disc Degeneration Adjacent to a Lumbar Fusion in Ovariectomized Rats. **Spine**, [s.l.], v. 40, n. 20, p.1073-1083, out. 2015.