UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MARIANA QUIRINO SILVEIRA SOARES

**Efeito da terapia de longa duração com ácido zoledrônico no osso
esponjoso da mandíbula e fêmur de ratos Wistar**

BAURU
2017

MARIANA QUIRINO SILVEIRA SOARES

**Efeito da terapia de longa duração com ácido zoledrônico no osso
esponjoso da mandíbula e fêmur de ratos Wistar**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências no Programa de Ciências
Odontológicas Aplicadas, na área de concentração
Estomatologia.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª Izabel Regina Fischer Rubira- Bullen

Versão corrigida

BAURU
2017

So11e Soares, Mariana Quirino Silveira
Efeito da terapia de longa duração com Ácido
Zoledrônico no osso esponjoso da mandíbula e fêmur
de ratos Wistar / Mariana Quirino Silveira Soares. –
Bauru, 2017.
89 p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de
Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof^a. Dr^a. Izabel Regina Fischer
Rubira-Bullen

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 022/2014
Data: 27/02/2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família e a todos que contribuíram com a minha jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

A Deus, por me proteger e guiar em cada passo dessa caminhada.

Aos meus amados pais e avós, pelo exemplo de trabalho e perseverança, pela dedicação e incentivo em cada etapa dessa jornada.

À minha irmã, pela amizade, incentivo e pelos valiosos conselhos.

Ao meu namorado, pela compreensão, companheirismo e pelo apoio em todos os momentos. Muito obrigada!

À professora Izabel Regina Fischer Rubira-Bullen, minha querida orientadora, pela confiança, paciência e por exercer a docência com tanto amor.

Aos professores do departamento de Estomatologia por todos os ensinamentos e pela contribuição inestimável para minha formação.

Aos Funcionários do departamento de Estomatologia, sempre prontos a ajudar.

Aos colegas de pós-graduação pela convivência, conhecimentos compartilhados e trabalhos desenvolvidos. Aos colegas Gustavo Zanna e Thais Imada pela contribuição para essa pesquisa.

Ao departamento de Histologia, em especial ao professor Gustavo Garlet e a funcionária Tânia Cestari por todo o apoio para que essa pesquisa fosse possível.

Ao Departamento de Endodontia, em especial ao Professor Marco Antônio Duarte que possibilitou o escaneamento das amostras.

À Faculdade de Odontologia de Bauru/ Universidade de São Paulo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de estudos e bolsa de estágio no exterior (processo nº 99999.007007/2015-09).

Agradeço também a todos os colaboradores internacionais que contribuíram com esse trabalho...

To my promoter at KU Leuven, professor Reinhilde Jacobs: thank you for receiving me in your Lab. Thank you for your advice and for giving me the unique opportunity to improve my skills as a researcher working with such a high qualified team as OMS-IMPACT.

To all my colleges and friends in Leuven, for the nice time we spent together. Thank you. I wish you all the best! I would like to thank Jeroen and Laura for their contribution to this research.

To Professor Ivo Lambrichts from the Biomedical Research Institute, Hasselt University, Diepenbeek, Belgium, who allowed us to scan the histological slides for the figures in this thesis.

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

José de Alencar

RESUMO

Os bisfosfonatos (BF) são amplamente utilizados no tratamento de doenças osteolíticas como metástases ósseas e osteoporose. A osteonecrose dos maxilares associada ao uso de BF (OMAB) é caracterizada pela presença de osso exposto ou que pode ser sondado através de uma fístula que persiste por mais de oito semanas em pacientes com história de terapia de BF e sem história de radioterapia na região de cabeça e pescoço e/ou sem doença metastática nos maxilares. A incidência de OMAB aumenta com a potência, duração do tratamento e dose de BF recebida. Até o presente momento, a fisiopatologia da OMAB não está clara, dificultando a prevenção e o tratamento. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da administração de altas doses de Ácido Zoledrônico (AZ) por período prolongado no osso esponjoso da mandíbula e da metáfise proximal do fêmur de ratos Wistar. Para relacionar as descobertas à fisiopatologia da OMAB, o regime de administração de BF de um modelo animal relevante desta lesão foi reproduzido. Seis animais receberam AZ (0,6 mg / kg) e seis receberam solução salina no mesmo volume (Controles). Os compostos foram administrados por via intraperitoneal em cinco doses a cada 28 dias. A eutanásia dos animais ocorreu após 150 dias de início da terapia. As hemimandíbulas e fêmures direitos foram escaneados usando Micro-tomografia computadorizada (Micro-CT) de alta resolução (14 µm). Para a primeira análise realizada neste estudo, os dados morfométricos do osso esponjoso foram calculados na região do segundo e primeiro molar na mandíbula e na metáfise do fêmur usando CTAnalyzer (Bruker, Bélgica). Para a segunda análise, cinco amostras de hemimandíbulas de cada grupo foram cortadas em lâminas histológicas (5 µm) e coradas com Hematoxilina e Eosina. Para comparar os parâmetros morfométricos na Micro-CT e histologia, as imagens de Micro-CT foram espacialmente alinhadas à histologia. Os dados morfométricos do osso alveolar foram calculados usando o software CTAnalyzer (Bruker, Bélgica) na região entre as raízes mesial e distal do primeiro molar. A densidade da área vascular (área vascular/área total; VA/TA) e os dados histomorfométricos ósseos foram estimados usando Axiovision na mesma região (entre as raízes mesial e distal do primeiro molar). Foi adotada significância estatística de 5% ($\alpha = 0,05$). Os animais tratados com AZ apresentaram aumento significativo na porcentagem de volume ósseo ($p < 0,05$) com trabéculas mais espessas, osso mais compacto com menor separação trabecular na mandíbula e no fêmur. Na mandíbula, o aumento da densidade óssea e diminuição da separação trabecular foram fortemente correlacionados com a diminuição da área vascular observada no grupo AZ ($p < 0,05$). Em conclusão, o tratamento de longa duração

com altas doses de AZ foi significativamente associado ao aumento na densidade óssea e à diminuição dos espaços medulares, canais nutritivos e vasculatura do osso alveolar. A análise com Micro-CT revelou alterações semelhantes na estrutura óssea tanto na mandíbula quanto no fêmur do grupo AZ.

Palavras-chave: Bisfosfonatos. Histologia. Microtomografia por raio-X. Osso esponjoso. Osteonecrose.

ABSTRACT

Effect of long-term zoledronic acid treatment on cancellous bone in the mandible and femur of Wistar rats

Bisphosphonates (BFs) are widely used in the treatment of osteolytic diseases such as bone metastases and osteoporosis. The osteonecrosis of the jaws related to BF (ONB) is characterized by the presence of exposed bone or bone that can be probed through a fistula that persists for more than eight weeks in patients with a history of BF therapy and without history of head and neck radiotherapy and / or without metastatic disease in the jaws. The incidence of ONB increases with potency, duration of treatment and dose of BF received. Thus far, the pathophysiology of ONB is unclear, hampering prevention and treatment. The aim of this study was to objectively assess the effect of long-term high-dose Zoledronic Acid (ZA) on cancellous bone in the jaw and femur of Wistar rats. In order to link our findings to the physiopathology of ONB, the therapeutic regiment of a relevant ONB animal model was reproduced. Twelve Wistar rats were randomly divided in two groups: six received Zoledronic acid (ZA; 0.6 mg / kg) and six (Controls) received saline solution in the same volume. The compounds were administrated intraperitoneally in five doses each 28 days. The rats were killed after 150 days of the therapy onset. Mandibles and femurs were scanned using a high-resolution (14 μ m) micro-computerized tomography (Micro-CT). For the first analysis carried in this study, cancellous bone morphometric data were calculates in the region of the second and first molar in the mandible and in the proximal femur using CTAnalyzer (Bruker, Belgium). For the second analysis five samples were cut into histological slices (5 μ m) and stained with Hematoxylin and Eosin. In order to compare the same morphological structures in Micro-CT and histology, the Micro-CT images were aligned to histology. Alveolar bone morphometric data (Micro-CT) was calculated using CTAnalyzer (Bruker, Belgium) in the region between the mesial and distal roots of the first molar. Blood vessels density and bone histomorphometric data were calculated using Axiovision (Carl Zeiss, Germany) in the same region used for Micro-CT evaluation. Statistical significance of 5% ($\alpha=0.05$) was adopted. ZA treated rats presented significant increase in the percentage of bone volume ($p<0.05$) with thicker trabeculae and more compact bone with smaller marrow spaces in the mandible and femur. In the mandible, the increase in bone density and decrease of marrow spaces size was strongly correlated with the decrease in the vascular area noticed in the ZA group ($p<0.05$).

In conclusion, long-term high-dose ZA treatment was significant associated with the increase of bone density and the diminution of medullary spaces and nutritive canals size as well as decrease in vascularity of the alveolar bone. Micro-CT investigation showed similar changes in bone structure in the mandible and femur in the ZA group.

Key words: Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. Diphosphonates. Cancellous Bone. Histology. X-ray Microtomography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura química dos bisfosfonatos e do pirofosfato.	25
Figura 2- Desenho simplificado representando o mecanismo de ação dos BF. Os BF se ligam à hidroxiapatita presente na matriz óssea mineral. Durante o processo de remodelação óssea a ligação dos BF à hidroxiapatita presente no osso se rompe e os BF são internalizados nas células osteoclásticas por meio de endocitose. Uma vez no interior da célula os BF interferem na função e induzem a apoptose dessas células.	26
Figura 3- Desenho simplificado representando a aquisição de imagens de Micro-CT <i>ex vivo</i> . O tubo microfocal (tubo de ânodo fixo de tungstênio) emite o feixe de raio X que é colimado e filtrado, restringindo o espectro de energia. Os raios X atravessam o objeto, e a imagem é gravada por um CCD (<i>charge-coupled device</i>) – dispositivo de carga acoplada bidimensional. Os dados são armazenados em um computador e reconstruídos em <i>voxels</i> isotrópicos utilizando um algoritmo de reconstrução volumétrico de feixe cônico (<i>Feldkamp algorithm</i>).	37
Figura 4- Protocolo de administração intraperitoneal das soluções de acordo com Maahs, et al (2011). Os animais receberam cinco doses das soluções, administradas a cada 28 dias.....	46
Figura 5- Imagem da interface da plataforma MeVisLab 2.8.1 (MeVis Medical Solutions AG, Alemanha) demonstrando o registro manual das imagens. A. Posição espacial das imagens logo após a importação (vermelho- amostra usada como referência para o registro; verde- amostra a ser reposicionada). B. imagens sobrepostas após o registro espacial.....	47
Figura 6- Imagem da interface do <i>software</i> MTM Scaffold (KU Leuven, Bélgica) demonstrando o alinhamento espacial das imagens após o registro automático baseado na informação contida em cada voxel. Nota-se o posicionamento espacial semelhante das amostras.....	47
Figura 7- Reconstruções tridimensionais mostrando o osso esponjoso segmentado dentro dos volumes de interesse selecionados para a morfometria óssea na mandíbula (vermelho) e no fêmur (azul). Na mandíbula toda a região de osso esponjoso foi selecionada excluindo apenas os reparos anatômicos na região do primeiro e segundo molar. No fêmur o osso esponjoso da metáfise foi selecionado.	48

Figura 8- Delimitação manual da área total e área de espaços medulares durante a histomorfometria óssea na região entre as raízes mesial e distal do primeiro molar. A partir dessas medidas a área total, área óssea e perímetro ósseo foram calculados. Aumento: 5X. ...	52
Figura 9- Histomorfometria da área dos vasos em relação à área total do campo analisado. A área vascular foi manualmente delimitada. Aumento: 20X.	52
Figura 10- Reconstrução tridimensional demonstrando o osso esponjoso segmentado dentro do VOI (verde) usado na quantificação dos parâmetros morfométricos na Micro-CT na investigação II. Foi selecionada a região entre as raízes mesial de distal do primeiro molar para a análise.	53
Figura 11- Seleção do volume de interesse e seguimentação para análise das imagens no <i>software</i> CTanalyzer® (Bruker, Bélgica). A. Imagem original; B. seleção da Região de Interesse (vermelho); C. <i>threshold</i> - binarização da imagem e segmentação do osso trabecular (branco) para a análise.	54
Figura 12- Medidas morfométricas tridimensionais (Micro-CT) do osso medular mandibular do grupo controle e AZ obtidas na investigação I. Asterisco: $p<0.05$	58
Figura 13- Medidas morfométricas tridimensionais (Micro-CT) do osso medular na metáfise do fêmur do grupo controle e AZ obtidas na investigação I. Asterisco: $p<0,05$	59
Figura 14- Reconstruções tomográficas das mandíbulas e fêmures do grupo controle (a e c) e AZ (b e d). Nota-se o aumento da densidade do osso trabecular e diminuição dos espaços medulares no grupo AZ tanto na mandíbula quanto no fêmur.	59
Figura 15- Investigação II- Medidas morfométricas tridimensionais (Micro-CT) na região de osso alveolar entre as raízes mesial e distal do primeiro molar mandibular direito no grupo controle e AZ. Asterisco $p<0,05$	60
Figura 16- Reconstruções tomográficas espacialmente alinhadas às fotomicroscopias do grupo controle (a e b) e grupo AZ (c e d). A presença de osso mais compacto e espaços de medulares menores foram observados no grupo AZ (c e d) em comparação com o grupo controle (a e b). Aumento: 2X.	61
Figura 17- Fotomicroscopia em maior aumento da região do terço cervical e médio entre as raízes mesial e distal do primeiro molar inferior no grupo controle e AZ. A) Controle: presença de vasos sanguíneos (asteriscos) e canais nutritivos maiores, linhas reversão finas e discretas (pontas de flechas); B) ZA: presença de canais nutritivos menores com mais tecido conjuntivo no seu interior (flechas), vasos sanguíneos menores, congestos (asteriscos) e linhas de reversão irregulares basofílicas mais espessas (pontas de flechas). Aumento: 20X.	62

Figura 18- Investigação II- Medidas histomorfométricas do osso alveolar entre as raízes mesial e distal do primeiro molar mandibular nos grupos controle e AZ. Asterisco: $p < 0,05$	63
Figura 19- Gráficos de dispersão demonstrando as correlações entre VA/TA, BV/TV e TB.Sp na investigação II. A. Correlações obtidas na análise histomorfométrica; B. Correlações obtidas na análise com Micro-CT.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estadiamento e estratégias terapêuticas para o tratamento de OMAB recomendados pela <i>American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons</i>	29
Tabela 2: Parâmetros morfométricos avaliados de acordo com o sistema de nomenclatura da American Society for Bone and Mineral Research. ^a Parâmetros avaliados na investigação I; ^b Parâmetros avaliados na investigação II (na investigação II foram selecionados somente os parâmetros que poderiam ser calculados na Micro-CT e histomorfometria).	49
Tabela 3- Parâmetros morfométricos avaliados de acordo com o sistema de nomenclatura da American Society for Bone and Mineral Research e fórmulas de cálculo estereológico a partir de medidas bidimensionais (área total (At) área óssea (Ao) e perímetro ósseo; Po) propostos por Parfitt et al (1983).	51

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AZ	Ácido Zoledrônico
BF	Bisfosfonatos
BS/TV	Superfície óssea/volume tecidual (<i>Bone surfasse/Tissue volume</i>)
BV	Volume ósseo (<i>Bone volume</i>)
BV/TV	Densidade óssea volumétrica: Volume ósseo/Volume tecidual (<i>Bone volume fraction</i>)
Conn.Dn	Densidade de conectividade
OMAB	Osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos
Po(tot)	Porosidade total
<i>P</i>	Probabilidade de significância estatística
ROI	Região de interesse (<i>region of interest</i>)
SMI	Índice de modelo estrutural (<i>Structrual model index</i>)
Tb.N	Número trabecular (<i>Trabecular number</i>)
Tb.Pf	Padrão trabecular (<i>Trabecular pattern factor</i>)
Tb.Sp	Separação trabecular (<i>Trabecular separation</i>)
Tb.Th	Espessura trabecular (<i>Trabecular thickness</i>)
TV	Volume tecidual (<i>Tissue volume</i>)
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>Vascular endotelial growth factor</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Símbolo de marca registrada
α	Nível de significância estatística
η^2_p	Eta quadrado parcial

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
2.	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	BISFOSFONATOS	25
2.2	OSTEONECROSE DOS MAXILARES	27
2.3	FISIOPATOLOGIA	30
2.4	MODELOS ANIMAIS	34
2.6	MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA (MICRO-CT)	36
3.	PROPOSIÇÃO	41
3.1	OBJETIVO GERAL	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4.	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	45
4.2	INVESTIGAÇÃO I - ANÁLISE DO IMPACTO DO AZ NA MICROESTRUTURA ÓSSEA DO FÊMUR E DA MANDÍBULA	46
4.2.1	Micro-CT	46
4.3	INVESTIGAÇÃO II- ANÁLISE DO IMPACTO DO AZ NA ESTRUTURA ÓSSEA E ÁREA VASCULAR DO OSSO ALVEOLAR	50
4.3.1	Histologia	50
4.3.1.1	Análise Estereológica	50
4.3.1.2	Histomorfometria Vascular	52
4.3.2	Micro-CT	53
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5.	RESULTADOS	57
5.1	INVESTIGAÇÃO I	57
5.2	INVESTIGAÇÃO II	59
5.2.1	Micro-CT	59
5.2.2	Histologia	60
5.2.2.1	Achados descritivos	60
5.2.2.2	Histomorfometria	63
5.2.3	Correlação entre as técnicas de Micro-CT e histomorfometria óssea	64
6.	DISCUSSÃO	67

7. CONCLUSÕES	77
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos (BF) são atualmente a classe de medicamentos mais amplamente utilizada no tratamento de distúrbios esqueléticos caracterizados por um aumento na reabsorção óssea, tais como doença óssea metastática (particularmente observada no mieloma múltiplo, câncer de mama e câncer de próstata), osteoporose, hipocalcemia e doença óssea de Paget (ZHANG et al., 2012; EID; ATLAS, 2014; HAGIWARA et al., 2014). Nos pacientes acometidos por essas doenças, os BF atuam suprimindo a atividade e induzindo a apoptose dos osteoclastos e, conseqüentemente, reduzindo as taxas de remodelação óssea (RUSSELL et al., 2008; RUSSELL, 2011). Clinicamente, os BF têm demonstrado valor na redução da dor óssea, na redução da recorrência de metástase óssea, na redução do risco complicações, tais como fraturas patológicas, e na melhora na qualidade de vida dos pacientes (DIEL et al., 2004; ABU-ID et al., 2008; RUSSELL et al., 2008; ZHANG et al., 2012; COLEMAN et al., 2015).

Os BF possuem propriedades farmacológicas únicas que os distinguem das outras terapias, incluindo a absorção seletiva no esqueleto preferencialmente em locais onde há aumento da remodelação óssea e longa retenção no tecido ósseo (CREMERS; PAPAPOULOS, 2011). Experimentos com modelos animais demonstraram que os BF mantêm ou melhoram as propriedades biomecânicas do osso tanto em animais saudáveis quanto em modelos de osteoporose conservando a arquitetura e resistência óssea (RUSSELL, 2011).

Embora o benefício e a segurança dos BF estejam bem estabelecidos, foram relatados importantes efeitos adversos tardios, principalmente relacionados às terapias de longo prazo (ex.: Fraturas atípicas do fêmur (FAF) e osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos; OMAB) (RUSSELL, 2011; FUNG et al., 2016). A principal preocupação em relação ao uso prolongado dos BF está relacionada à possibilidade de supressão excessiva da remodelação óssea que pode prejudicar a força óssea e a resposta às lesões locais (RUSSELL, 2011; LIU et al., 2014). Esta preocupação é apoiada por evidências de que a administração de altas doses de BF por longos períodos comprometem a resposta óssea aos microtraumas nas vértebras, osso ilíaco e fêmur em modelos animais (MASHIBA et al., 2000; MASHIBA et al., 2001; KOMATSUBARA et al., 2003; KOMATSUBARA et al., 2004).

A OMAB é caracterizada por osso exposto ou que pode ser sondado através de uma fístula intraoral ou extraoral que persiste por mais de oito semanas em pacientes com história de terapia de BF e sem radioterapia anterior na região de cabeça e pescoço e/ou sem doença metastática nos maxilares (RUGGIERO et al., 2014). Os pacientes afetados, além de exposição

óssea / necrose, podem apresentar úlcera da mucosa bucal, dor, infecção, edema, fistula, trismo, sinusite, alterações estéticas, dificuldades para falar, deglutir e se alimentar. Nos casos mais avançados, fraturas patológicas podem ocorrer (ABU-ID et al., 2008; MIKSAD et al., 2011; YONEDA et al., 2016). Estes sinais e sintomas associados às constantes intervenções clínicas para o tratamento levam à diminuição significativa na qualidade de vida do doente à medida que a gravidade da OMAB aumenta (MIKSAD et al., 2011).

A patogênese da OMAB parece ser multifatorial e não é completamente compreendida, dificultando a prevenção e o tratamento. A intensa supressão da remodelação óssea e as propriedades antiangiogênicas dos BF têm sido apontadas como uns dos principais mecanismos envolvidos (ALTUNDAL; GUVENER, 2004; ALLEN; BURR, 2009). Juntos, esses dois efeitos dos BF poderiam comprometer a resposta óssea às lesões e infecções locais (ALLEN; BURR, 2009). Estudos prévios suportam essa hipótese (MASHIBA et al., 2000; HOEFERT et al., 2010; VIEILLARD et al., 2010; GUEVARRA et al., 2015). Hoefert, et al. (2010) relataram a presença de microfraturas em biópsias ósseas dos pacientes com OMAB (HOEFERT et al., 2010). Pesquisas anteriores também demonstraram que os BF diminuem a vascularização óssea e o fluxo sanguíneo em ossos longos, calvária e ossos do maxilar (KAPITOLA; ZAK, 1998; VIEILLARD et al., 2010; GUEVARRA et al., 2015). O efeito sítio-específico dos BF também sido amplamente discutido e apontado como provável justificativa para a ocorrência quase que restrita de osteonecrose nos maxilares (RENDERS et al., 2014; VERMEER;RENDERS; EVERTS, 2016). Wen, et al. (2011) demonstraram que o risedronato apresenta maior acumulação na mandíbula em comparação aos ossos axiais e apendiculares (WEN et al., 2011). Entretanto, não existem evidências de que os BF induziriam alterações distintas na estrutura óssea de diferentes sítios.

Até o presente momento, a maioria dos estudos pré-clínicos que investigaram as alterações ósseas induzidas pelos BF em modelos animais, avaliaram as regiões dos alvéolos após a exodontia em modelos de OMAB (JABBOUR et al., 2014; CORDOVA et al., 2016). Embora esses estudos sejam importantes para descrever a influência dos BF no reparo ósseo e para o desenvolvimento de novas estratégias clínicas de tratamento da OMAB, os resultados são influenciados pela presença de inflamação e da lesão de OMAB. A investigação dos efeitos da administração do AZ no osso saudável é fundamental para elucidar as alterações na homeostasia óssea que podem representar o primeiro passo para o desenvolvimento da OMAB. Em uma análise tridimensional da microarquitetura óssea mandibular, Imada, (2013) demonstrou que o tratamento com Ácido Zoledrônico (AZ), um bisfosfonato potente, induz um aumento significativo na densidade do osso mandibular com aumento na espessura trabecular

e trabéculas mais conectadas. Agora, levanta-se a hipótese de que a supressão da remodelação óssea induzida pelo tratamento de longa duração com altas doses de BF poderia induzir mudanças na estrutura óssea levando a um osso esclerótico e menos vascularizado na mandíbula e em outras áreas do esqueleto. Esse efeito pode levar a comprometimento na resposta óssea às lesões e infecções locais e assim, contribuir para o desenvolvimento da lesão OMAB.

2. Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BISFOSFONATOS

Os BF são amplamente prescritos para o tratamento de doenças osteolíticas (RUSSELL, 2011). Atualmente, não existem estimativas que apontem o número de pacientes em tratamento com BF no Brasil. Entre os anos de 2005 a 2009, somente nos Estados Unidos da América, mais de 150 milhões de prescrições de BF orais (risedronato, alendronato e ibandronato) para o tratamento de osteoporose foram emitidas. Estima-se que neste período 5,1-5,7 milhões de pessoas receberam BF naquele país (FDA, 2011).

Os BF são compostos estáveis análogos ao pirofosfato inorgânico que possuem grande afinidade pela hidroxiapatita. A estabilidade dos BF é conferida pelo átomo de carbono que substitui o átomo de oxigênio presente na estrutura química do pirofosfato, conectando os dois átomos de fosfato (BAMIAS et al., 2005; RUSSELL et al., 2008). Os grupos R_1 e R_2 são responsáveis pela ligação dos BF ao osso e pela função antirreabsortiva dos mesmos (Figura 1). Modificações na estrutura química desses grupos alteram significativamente a potência desses medicamentos. Atualmente, os BF mais potentes disponíveis para uso clínico são aqueles que apresentam em sua estrutura um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico na cadeia R_2 (risedronato e AZ) (RUSSELL et al., 2008).

Figura 1: Estrutura química dos bisfosfonatos e do pirofosfato.

Fonte: CASTRO et al. (2004)

Figura 2- Desenho simplificado representando o mecanismo de ação dos BF. Os BF se ligam à hidroxiapatita presente na matriz óssea mineral. Durante o processo de remodelação óssea a ligação dos BF à hidroxiapatita presente no osso se rompe e os BF são internalizados nas células osteoclásticas por meio de endocitose. Uma vez no interior da célula os BF interferem na função e induzem a apoptose dessas células.

Fonte: Adaptado de Russel et al (2008)

Os BF interferem no recrutamento e na diferenciação, além de proporcionar a diminuição da atividade e/ou o aumento da taxa de apoptose dos osteoclastos. Em consequência desse efeito inibidor sobre a função dos osteoclastos, a formação óssea que ocorre na dependência de reabsorção é diminuída, resultando em uma menor taxa de remodelação óssea (RUSSELL, 2011). Os BF são seletivamente internalizados pelos osteoclastos. A ligação preferencial dos BF a hidroxiapatita na superfície óssea os coloca em contato próximo com os osteoclastos. Durante a reabsorção óssea, o PH ácido nas lacunas de reabsorção facilita a ruptura da ligação entre os BF e a hidroxiapatita. Uma vez internalizados pelo osteoclastos por meio da endocitose, os BF interrompem o citoesqueleto celular e prejudicam a função dos osteoclastos ao induzir a ausência de borda enrugada (RUSSELL et al., 2008; RUSSELL, 2011) (Figura 2). Acredita-se que os BF que apresentam nitrogênio na sua estrutura química também interfiram na via do mevalonato (responsável, por exemplo, pela manutenção da membrana celular), induzindo a apoptose do osteoclasto (RUSSELL, 2011). Evidências indicam que os BF também modulam a proliferação e diferenciação de células da linhagem osteoblástica, apresentando efeito estimulante ou inibitório dessas células dependente da dose *in vitro* (BELLIDO; PLOTKIN, 2011). Os BF também promovem a sobrevivência dos osteócitos e dos osteoblastos evitando a apoptose (WEINSTEIN, 2000).

Em estudos experimentais e clínicos, o tratamento com BF preserva a microarquitetura óssea, mantém ou melhora as propriedades e força biomecânicas ósseas. Os

benefícios clínicos incluem redução da dor óssea, melhora da qualidade de vida dos pacientes e prevenção de complicações como fraturas patológicas (ABU-ID et al., 2008; RUSSELL et al., 2008; RUGGIERO et al., 2014). No entanto, existe uma grande preocupação sobre se doses elevadas desses medicamentos administradas por longos períodos de tempo poderiam diminuir a renovação óssea em tal nível que a capacidade de reparo e resistência óssea seriam comprometidas. Esta preocupação é corroborada por estudos que demonstram que doses elevadas de BF estão associadas ao aumento de defeitos microscópicos e até à fratura em modelos pré-clínicos (FLORA et al., 1981; MASHIBA et al., 2000; MASHIBA et al., 2005).

Os BF podem ser administrados por via oral ou endovenosa. Os administrados por via endovenosa são mais potentes que os administrados por via oral (EID; ATLAS, 2014). Os efeitos adversos associados ao uso dos BF são pouco comuns e são observados principalmente na administração endovenosa desses fármacos. Os efeitos adversos incluem pirexia, comprometimento da função renal, hipercalcemia e OMAB. Os BF administrados oralmente também podem causar diarreia e gastrite (EID; ATLAS, 2014). Além disso, recentemente vários casos de FAF concomitantes as terapias com BF têm sido relatados (SANCHEZ; BLANCO, 2016). Tanto a OMAB quanto a FAF têm sido associadas às terapias de longa duração com BF, entretanto a OMAB é mais comum em pacientes que recebem altas doses de BF adjuvantes ao tratamento oncológico, enquanto a FAF é mais comum nos tratamentos com baixas doses para a osteoporose (AGARWAL et al., 2010; KHAN et al., 2015). Assim, é provável que essas doenças apresentem fisiopatologias distintas (COMPSTON, 2011).

2.2 OSTEONECROSE DOS MAXILARES

A OMAB foi a primeira complicação associada ao uso prolongado de BF descrita (MARX, 2003). Em 2007, a OMAB foi definida como uma exposição óssea nos maxilares com fístula persistente por mais de oito semanas em paciente em tratamento com BF que não tenham sido submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço ou apresentem doença metastática nos maxilares (KHOSLA et al., 2007). Recentemente, a *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* sugeriu que o uso do termo “Osteonecrose dos Maxilares associada ao uso de Medicamentos” para acomodar os crescentes casos de osteonecrose associados ao uso de Demosumab e drogas antiangiogênicas (RUGGIERO et al., 2014). A incidência da OMAB varia de 0,7-6,7% nos pacientes submetidos a tratamentos com BF intravenosos. Os pacientes

submetidos a tratamento com BF oral apresentam risco significativamente menor (REID; CORNISH, 2012; RUGGIERO et al., 2014). Embora seja, aparentemente, um efeito adverso pouco frequente, o grande número de pacientes tratados com BF, a morbidade associada aos sinais e sintomas, e a existência de fatores locais da cavidade oral que aumentam o risco para OMAB tornam essa doença altamente relevante para a odontologia (KHOSLA et al., 2007; REID; CORNISH, 2012; RUGGIERO et al., 2014; KHAN et al., 2015).

Clinicamente, a OMAB apresenta-se como uma área de exposição de osso necrótico avascular muito semelhante a uma osteomielite dos maxilares (ABU-ID et al., 2008). Em 65% dos casos a lesão está localizada na mandíbula, em 26% na maxila e em 9% em ambos (WOO;HELLSTEIN; KALMAR, 2006). As lesões também são mais prevalentes em áreas com mucosa fina que cobrem proeminências ósseas, como tori, exostoses e a crista mio-hióidea (KHAN et al., 2015). Além da presença do osso necrótico exposto, os pacientes podem apresentar dor, infecção, inflamação do tecido mole adjacente à lesão, sinusite, comunicação buco-sinusal ou buco-nasal e fratura (KHAN et al., 2015).

O exame radiográfico revela zona radiolúcida ou de osso esclerótico de maior diâmetro que o observado clinicamente, em alguns casos observa-se a presença de um “alvéolo persistente” após exodontia o que tem sido descrito como um sinal típico da OMAB (ABU-ID et al., 2008; KHAN et al., 2015). Os achados radiográficos também incluem espessamento do ligamento periodontal, espessamento da lâmina dura com diminuição do tamanho do ligamento periodontal e osso trabecular mais denso (RUGGIERO et al., 2014). A gravidade desses sinais e sintomas é utilizada para classificação do estágio da doença e determinação da conduta clínica (Quadro 1; RUGGIERO et al., 2014).

Os achados histológicos incluem: 1. áreas com intenso infiltrado inflamatório, detritos necróticos acelulares, vasos sanguíneos de paredes finas e dilatadas, espículas ósseas intensamente basofílicas e lacunas de reabsorção óssea. 2. Áreas de sequestro ósseo, acelulares com lacunas de osteócitos vazias e grandes canais nutritivos com células inflamatórias em seu interior. 3. áreas não necróticas adjacentes a lesão apresentando maiores quantidades de osso, com aumento da espessura trabecular, deposição óssea interosteônica e canais de nutritivos menores (FAVIA;PILOLLI; MAIORANO, 2009).

O risco de OMAB aumenta com a potência dos BF. A maioria dos casos (94%) ocorre após tratamentos endovenoso com BF que apresentem nitrogênio em sua composição (WOO;HELLSTEIN; KALMAR, 2006). O Ácido Zoledrônico (AZ; Zometa®; Novartis Pharmaceuticals Corp., East Hanover, NJ) é um bisfosfonato de quarta geração que contém um átomo de nitrogênio dentro do anel heterocíclico da sua estrutura química e é administrado por

via intravenosa. O AZ é o bisfosfonato mais potente disponível para uso clínico atualmente (CONTE; GUARNERI, 2004). O risco de OMAB nos pacientes que receberam AZ mensalmente durante o tratamento oncológico é 50 a 100 vezes maior do que nos pacientes tratados com placebo (RUGGIERO et al., 2014). Adicionalmente, a incidência de OMAB também aumenta com a longa duração do tratamento (BAMIAS et al., 2005; MARX et al., 2005; KWON et al., 2015).

Tabela 1- Estadiamento e estratégias terapêuticas para o tratamento de OMAB recomendados pela *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeries*.

Estágio	Sinais e sintomas	Conduta Clínica
Em risco	Pacientes que não apresentam sinais e/ou sintomas aparentes de OMAB, mas estão em tratamento com BF	Orientação do Paciente
0	Sem evidência clínica de OMAB, mas apresenta sintomas e achados clínicos e radiográficos inespecíficos	Manejo sistêmico, incluindo o uso de analgésicos e antibióticos
1	Presença de exposição óssea ou fístula sem sintomatologia ou infecção	Bochechos com antibióticos; acompanhamento clínico; Orientação do Paciente; Revisão das indicações para continuação do tratamento com BF
2	Exposição óssea ou fístula associada a infecção evidenciada por presença de dor e eritema com ou sem drenagem purulenta	Tratamento sintomático com antibióticos; bochechos com antibacteriano; controle da dor; debridamento
3	Exposição óssea com dor, infecção e ≥ 1 dos seguintes achados: comunicação buco-sinusal ou buco-nasal, osteomielite estendendo para a base da mandíbula, soalho do seio maxilar, e/ou fraturas patológicas.	Tratamento sintomático com antibióticos; bochechos com antibacteriano; controle da dor; debridamento cirúrgico ou ressecção

Fonte: RUGGIERO et al. (2014)

O trauma (extrações dentárias), infecções odontogênicas e periodontais têm sido apontados como importantes fatores de risco locais (BAMIAS et al., 2005; MARX et al., 2005). Comorbidades, como o diabetes e o uso concomitante de corticosteroides são os principais fatores sistêmicos associados ao aumento no risco de OMAB (MARX et al., 2005).

De acordo com Abu-id et al. (2008) os pacientes submetidos a terapia com BF podem ser alocados em dois grupos de acordo com o risco de desenvolvimento de OMAB: 1- Alto risco: paciente portador de doença maligna que recebeu terapia intravenosa com bisfosfonato (AZ ou Pamidronato) e com história de quimioterapia, radioterapia ou o uso atual de esteroides exógenos. 2- Baixo risco: pacientes que fazem terapia oral com BF sem história de quimioterapia, terapia de radiação ou uso atual de esteroides exógenos (principalmente pacientes com osteoporose não-esteroide-induzida).

Bamias et al. (2005) relataram que a incidência de OMAB aumenta de 1,5% em doentes tratados durante 4 a 12 meses para 7,7% em pacientes tratados de 37-48 meses. Nenhum paciente que recebeu menos de 12 infusões de BF desenvolveu osteonecrose. O tempo de exposição médio ao medicamento para pacientes que desenvolveram OMAB foi quase o dobro da exposição dos pacientes que não desenvolveram. Estes resultados demonstram a direta relação entre a duração e dose da terapia e o risco de desenvolvimento de OMAB (BAMIAS et al., 2005). Os autores enfatizam que a diminuição contínua potente na remodelação óssea causada por AZ pode levar a um aumento da fragilidade óssea em longo prazo que, em combinação com outros fatores locais, contribuem para o desenvolvimento da OMAB (BAMIAS et al., 2005).

A principal preocupação em relação à OMAB é que esta é resistente aos tratamentos empregados usualmente para osteomielite. Abu-id, et al. (2008) reportaram que o tratamento conservador com desinfecção local e antibióticos foi ineficaz em 61.5% dos casos. A ressecção cirúrgica apresenta melhor resultado sendo eficaz em 86.4% dos casos (ABU-ID et al., 2008).

2.3 FISIOPATOLOGIA

O exato mecanismo pelo qual ocorre a formação da OMAB e as razões pelas quais se trata de uma complicação de incidência quase restrita aos maxilares ainda não está claro na literatura (FDA, 2011; RUGGIERO et al., 2014; KHAN et al., 2015). Até agora, os mecanismos descritos para explicar a patogênese OMAB incluem: alta concentração dos BF nos maxilares, inibição da excessiva da remodelação óssea; toxicidade dos BF sobre dos tecidos moles e supressão da migração de células epiteliais; mudanças na vigilância imunológica; e efeitos antiangiogênicos dos BF (WEN et al., 2011; YONEDA et al., 2016). A diminuição do Ph local

provocada pelos BF também parece contribuir para a formação da OMAB (EID; ATLAS, 2014).

Vários autores têm sugerido que os BF apresentam efeito sítio-específico nos ossos gnáticos uma vez que seu efeito nocivo nos maxilares parece contrastar com os efeitos benéficos apresentados em ossos longos (RENDERS et al., 2014; VERMEER;RENDERS; EVERTS, 2016). Especificidades fisiológicas e anatômicas desses ossos podem contribuir para essas diferenças. O tecido mineral nos ossos longos é originado a partir de uma cartilagem intermediária (formação endocondral) enquanto a mandíbula e a maxila apresentam origem intramembranosa (VERMEER;RENDERS; EVERTS, 2016). Os ossos longos contêm mais gordura no tecido medular e mais células precursoras de osteoclastos que a mandíbula (DE SOUZA FALONI et al., 2011). O teor de colágeno e de cálcio também é maior na mandíbula em comparação aos ossos longos (VERMEER;RENDERS; EVERTS, 2016). Visto que os BF se ligam a hidroxiapatita, a maior presença de tecido mineralizado justificaria uma maior captação de BF na mandíbula (WEN et al., 2011). Adicionalmente, os maxilares estão constantemente expostos a microbiota bucal (ALLEN, 2011).

Wen, et al. (2011), com o objetivo de investigar se os BF apresentam maior concentração nos maxilares, avaliaram a biodistribuição e a biodisponibilidade do pamidronato (associado a um contraste fluorescente) na mandíbula, nos ossos axiais (costelas e vértebras) e nos ossos apendiculares (úmero, ulna, fêmur, tíbia e fibula) de ratos. Os autores observaram um maior sinal na região do côndilo e no corpo da mandíbula (região dos molares). Nos ossos longos houve uma maior captação nas regiões mesial e distal (WEN et al., 2011). Nota-se que em ambos os ossos essas são as regiões onde há maior presença de osso trabecular na espécie animal investigada.

No mesmo estudo, quando comparada à captação entre os diferentes ossos, num primeiro momento, a mandíbula demonstrou concentração de pamidronato similar aos ossos apendiculares, mas menor que os ossos axiais. Após 120h a mandíbula ainda apresentava maior concentração que os ossos axiais e apendiculares indicando que houve maior acumulação de BF no osso mandibular em comparação aos outros sítios (WEN et al., 2011).

Allen, et al. (2009) investigaram o efeito do AZ em doses oncológicas e do Alendronato em doses equivalentes as utilizadas para o tratamento de osteoporose nas taxas de remodelação óssea na mandíbula, costela e tíbia de cães. Após três meses o grupo tratado com AZ apresentou supressão da remodelação óssea na mandíbula 95% maior que o grupo controle. Após seis meses o grupo AZ apresentou supressão quase completa da remodelação óssea (99%) na mandíbula. Em relação aos outros sítios investigados, após três meses o AZ induziu 83% e

75% de supressão da remodelação na costela e tíbia, respectivamente. Após seis meses, 85% (costela) e 68% (tíbia) de supressão foram observados. Os animais tratados com alendronato não apresentaram supressão significativa da remodelação óssea em nenhum dos sítios investigados (ALLEN;KUBEK; BURR, 2010). Esses resultados apontam para um efeito sítio-específico do AZ. Além do mais são indícios de que a supressão óssea tal qual como ocorre com a incidência de OMAB também aumenta com a potência dos BF administrados e com o tempo de exposição aos medicamentos.

A intensa supressão da remodelação óssea tem sido cada vez mais aceita como um dos fatores chave na fisiopatologia da OMAB. Vários estudos têm apontado que o tratamento com BF resulta em um aumento significativo da presença de micro lesões no osso (MASHIBA et al., 2000; MASHIBA et al., 2001; KOMATSUBARA et al., 2003; KOMATSUBARA et al., 2004; MASHIBA et al., 2005). A razão pela qual ocorre essa acumulação não está clara; provavelmente tanto o aumento na mineralização quanto a redução na remodelação são responsáveis por esse efeito (ALLEN, 2011). A supressão intensa dos osteoclastos impediria o reparo de pequenos defeitos induzidos por estresse mecânico e levaria a acumulação de microfraturas e perda da resistência do tecido ósseo (HOEFERT et al., 2010; ALLEN, 2011; RUSSELL, 2011).

Hoefert, et al. (2010) investigaram a presença de microfraturas em biópsias dos ossos maxilares de pacientes com OMAB (30 pacientes oncológicos e cinco com osteoporose); osteomielite (OM; n=5); pacientes submetidos a radioterapia a cima de 50Gy (RA; sete com osteorradionecrose e três sem alterações ósseas); pacientes com osteoporose em tratamento com BF (OBF; n=7); e pacientes com osteoporose sem tratamento (OP; n=6). A presença de microfraturas foi observada nos grupos OMAB, OBF e OP. Não foram observadas microfraturas nos grupos OM e RA. Apesar da ausência diferenças significantes na análise estatística, um número maior de microfraturas foi observado no grupo OMAB em relação aos grupos OBF e OP. Embora os resultados daquela pesquisa possam ter sido influenciados pelo pequeno número de amostras e pela heterogeneidade dos grupos, eles sugerem que a supressão da remodelação e da capacidade de reparo ósseo pode desempenhar um papel importante na etiologia da OMAB (HOEFERT et al., 2010).

Além do mais, o Denosumab, um inibidor de RANKL, suprime a remodelação óssea em um grau similar aos BF e também tem sido associado à ocorrência de osteonecrose dos maxilares (RUGGIERO et al., 2014). Dadas as diferenças no mecanismo de ação entre os BF e Denosumab, a supressão da remodelação óssea (ponto comum entre as duas classes de

medicamento) tem sido apontada como um fator etiológico provável da osteonecrose dos maxilares (AGHALOO;FELSENFELD; TETRADIS, 2010).

A homeostase do osso normal envolve a reabsorção do osso por osteoclastos e deposição de osso novo por osteoblastos. Em geral, o volume ósseo e a mineralização tecidual aumentam quando a taxa de reabsorção diminui (BOIVIN et al., 2009). Os BF reduzem a perda óssea ao reduzir a atividade dos osteoclastos. Eles reduzem tanto a quantidade quanto o tamanho dos sítios de reabsorção ativos (ALLEN et al., 2010). Os sítios que estão sendo ativamente remodelados no momento do início do tratamento com BF continuam a ser preenchidos normalmente com osso recém-formado (RUSSELL et al., 2008; ALLEN et al., 2010; ALLEN, 2011). Consequentemente, o osso tratado se torna mais uniforme e denso (BOIVIN et al., 2000).

O aumento na densidade do osso trabecular pode estar associado à diminuição na vascularização na mandíbula (GARCIA et al., 2013). A vascularização local desempenha um papel crítico na remodelação óssea e na cicatrização. A diferenciação e atividade dos osteoclastos estão diretamente ligadas à estimulação da angiogênese tanto no desenvolvimento quanto na remodelação óssea. Assim, a inibição do osteoclastos diminui a angiogênese no microambiente ósseo (CACKOWSKI et al., 2010). Os efeitos antiangiogênicos dos BF, a inibição da proliferação, migração e adesão de células endoteliais, bem como a indução de diminuição do fluxo sanguíneo em ossos longos têm sido relatados (KAPITOLA; ZAK, 1998; VASCONCELOS et al., 2013). Altas doses intravenosas de ZA foram capazes de induzir a diminuição na densidade dos pequenos vasos e diminuição do comprimento da rede vascular na calvária de ratos (VIEILLARD et al., 2010).

A diminuição do suprimento sanguíneo devido às propriedades antiangiogênicas dos BF também foi apontada como importante fator na formação da lesão de OMAB (ALLEN; BURR, 2009). No entanto, alguns autores afirmam que há pouca evidência para a teoria da isquemia induzida pelos BF na patogênese da OMAB, uma vez que os exames histológicos relatam a presença de vasos sanguíneos evidentes na região das lesões (HANSEN et al., 2006; REID; CORNISH, 2012).

Guevarra, et al (2015) perfundiram contraste radiopaco em ratos para realizar o exame *ex vivo* tridimensional com microtomografia computadorizada (Micro-CT) da estrutura vascular da mandíbula após a indução de OMAB com administração de AZ associada à exodontia. Os autores observaram que nos ratos tratados com AZ apresentaram menor grau de anastomose dos vasos sanguíneos e menor quantidade de vasos menores (capilares). No entanto, os autores não conseguiram esclarecer se essas alterações ocorreram como efeito

antiangiogênico do AZ ou simplesmente como consequência da necrose óssea na região (GUEVARRA et al., 2015).

Bork. et al (2015) também usaram contraste radiopaco para realizar exames de Micro-CT *ex vivo* e avaliaram a expressão gênica do fator de crescimento endotelial A (VEGF-A), um marcador de angiogênese, no osso mandibular de ratos tratados com AZ e submetidos à exodontia. Os autores observaram que, após quatro semanas, a região de extração apresentava ferida aberta e um aumento significativo de VEGF-A, no osso circundante. No entanto, os ratos tratados com AZ apresentaram uma área de vasos sanguíneos, ramificação e conectividade significativamente menor. (BORKE et al., 2015).

Até o presente momento, a maioria dos estudos que descrevem os efeitos dos BF na remodelação e arquitetura óssea investigaram modelos animais ovariectomizados e biópsias ósseas de pacientes com osteoporose (BOIVIN et al., 2000; BROUWERS et al., 2008; RECKER et al., 2008; PERILLI et al., 2010; HATORI et al., 2015). Embora essas investigações sejam importantes para definir a eficácia clínica desses medicamentos, a presença da doença subjacente influencia a mensuração do impacto do medicamento na estrutura óssea. Além do mais, esses estudos não refletem a realidade de todos os pacientes tratados com BF, uma vez que muitos dos que recebem altas doses de BF apresentam doenças oncológicas restritas a sítios específicos. Um estudo sobre os efeitos do tratamento dos BF em animais saudáveis poderia elucidar os efeitos dos BF na homeostasia óssea em diferentes sítios.

2.4 MODELOS ANIMAIS

Os estudos clínicos em humanos fornecem importantes informações sobre os fatores de risco, incidência e manejo clínico dos pacientes com OMAB (RUGGIERO et al., 2004; MARX et al., 2005; ABU-ID et al., 2008; RUGGIERO et al., 2014). Entretanto, a utilização de modelos animais é essencial para o estudo da fisiopatologia da OMAB e para fornecer base racional e ética para ensaios clínicos em humanos que possam investigar alternativas de tratamento e prevenção dessa doença (KHOSLA et al., 2007). Modelos Animais de OMAB têm sido induzidos em diferentes espécies (ALLEN; BURR, 2008; MAAHS et al., 2011; PAUTKE et al., 2012; BARBA-RECREO et al., 2014). No entanto, uma grande limitação nestes estudos é que os sintomas subjetivos, como a dor, uma característica comum da OMAB,

não podem ser obtidos e registrados com precisão. O diagnóstico de OMAB deve, portanto, ser alcançado por avaliação clínica e histológica (SHARMA et al., 2013).

Idealmente, um modelo animal de OMAB deve imitar a descrição clínica da lesão após a administração de um regime de BF que seja compatível com o utilizado em humanos. Especificamente, tem que cumprir os critérios de exposição clínica do osso do maxilar que não cicatrizam após oito semanas, com história concomitante de uso de BF (especialmente BF contendo nitrogênio em sua composição e de administração intravenosa) e na ausência de radioterapia (RUGGIERO et al., 2009; SHARMA et al., 2013).

Historicamente, roedores como ratos e camundongos foram o animal escolhido como modelo para a pesquisa da maioria das doenças humanas. Eles são principalmente adequados por sua facilidade de manutenção e manipulação, alta capacidade reprodutiva, mapeamento completo do genoma, que facilita ainda mais a engenharia genética para se adequar à doença a ser estudada, e, acima de tudo, a similaridade genética com os seres humanos (SHARMA et al., 2013). O modelo animal de OMAB em ratos apresenta várias vantagens, entre elas a dose relativamente alta de BF tolerada pelos animais e a possibilidade de realização de exodontias com alta precisão e mínimo dano ao animal (GIANNOBILE, 2011).

2.5 HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA

O estudo da microarquitetura óssea baseia-se na medida da largura, número e separação das trabéculas, bem como na sua organização espacial e conectividade (DALLE CARBONARE et al., 2005). A histomorfometria óssea é a técnica na qual o exame histológico de amostras descalcificadas de tecido ósseo é realizado para obter informações quantitativas a respeito da estrutura e remodelação óssea (KULAK; DEMPSTER, 2010). Trata-se de um método amplamente utilizado para acessar as propriedades estruturais do osso medular em pesquisas laboratoriais e clínicas (DIAS et al., 2015; LIU et al., 2016). A análise histomorfométrica é um importante índice para avaliação do efeito de doenças metabólicas e medicações que interferem no metabolismo ósseo (DALLE CARBONARE et al., 2005). A partir da análise histológica (bidimensional), quatro parâmetros podem ser quantificados: área, perímetro, distância entre pontos e número (DEMPSTER et al., 2013). Parâmetros estruturais tridimensionais como número de trabéculas, espessura trabecular e separação trabecular, são calculados com base em estereologia usando fórmulas matemáticas (PARFITT et al., 1983).

A estereologia é uma ciência aplicada que aborda a dedução da estrutura tridimensional a partir das observações feitas em duas das três dimensões de um objeto. A estereologia trata de áreas e volumes de corpos definidos de geometria sólida, como esferas, cubos e poliedros. É uma ciência interdisciplinar com aplicação da metodologia para biologia e medicina, bem como para ciências dos materiais, e agricultura (CARPENTER, 1979).

Em 1983, Parfit et al. propuseram fórmulas para o cálculo de parâmetros tridimensionais para a investigação de alterações da estrutura óssea trabecular induzidas por osteoporose e envelhecimento a partir da biópsia de osso ilíaco. Desde então essa metodologia tem sido amplamente utilizada (DALLE CARBONARE et al., 2005; DEMPSTER et al., 2013; DIAS et al., 2015; LIU et al., 2016). Entretanto, algumas limitações devem ser pontuadas: as análises histológicas são demoradas; as medidas podem ser influenciadas pelo plano de secção da amostra e região escolhida para a análise. Além disso, é uma técnica destrutiva uma vez que o processamento histológico impede que as mostras sejam preservadas para outras análises adicionais (PARFITT et al., 1983; DIAS et al., 2015; LIU et al., 2016).

2.6 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (Micro-CT)

A Micro-CT tem demonstrado grande valor na análise não invasiva do tecido ósseo. Esta técnica representa um importante recurso para a investigação da microarquitetura óssea que possibilita a análise quantitativa tridimensional de parâmetros da morfologia do osso trabecular, como a espessura trabecular, número de trabéculas ósseas, a separação trabecular, volume ósseo, fração de volume ósseo e densidade óssea, dentre outros. Assim, a Micro-CT é considerada o padrão ouro para a quantificação da arquitetura óssea (SWAIN; XUE, 2009).

Em geral, a Micro-CT produz imagens tridimensionais em alta resolução em voxel isotrópico ($\leq 100\mu\text{m}^3$) a partir de dados de atenuação de raios X obtidos por meio de centenas de projeções bidimensionais adquiridas em diferentes ângulos em torno da amostra (CLARK; BADEA, 2014) (Figura 2). Nos sistemas para escaneamento *ex vivo*, na maioria dos equipamentos, o tubo de raios X e o detector permanecem imóveis enquanto a amostra se movimenta em torno do seu próprio eixo. Já nos sistemas *in vivo* a amostra permanece imóvel enquanto o tubo de raios X e o detector se movimentam (CLARK; BADEA, 2014).

A Micro-CT foi introduzida por Feldkamp et al. (1989) e validada por Muller, et al (1998) para a investigação tridimensional da arquitetura trabecular (FELDKAMP et al., 1989; MULLER et al., 1998). Os autores avaliaram a correlação entre as medidas morfométricas tridimensionais (Micro-CT) e os parâmetros histomorométricos calculados por meio de estereologia em 63 biópsias de osso ilíaco humano. Uma forte correlação positiva e pequena diferença em relação aos valores absolutos foram observadas entre os dados obtidos nas duas análises (MULLER et al., 1998).

Figura 3- Desenho simplificado representando a aquisição de imagens de Micro-CT *ex vivo*. O tubo microfocal (tubo de ânodo fixo de tungstênio) emite o feixe de raio X que é colimado e filtrado, restringindo o espectro de energia. Os raios X atravessam o objeto, e a imagem é gravada por um CCD (*charge-coupled device*) – dispositivo de carga acoplada bidimensional. Os dados são armazenados em um computador e reconstruídos em *voxels* isotrópicos utilizando um algoritmo de reconstrução volumétrico de feixe cônico (*Feldkamp algorithm*).

Fonte: Adaptado de Strauber e Muller (2008) e Clark et al (2014)

Dentre as principais vantagens da Micro-CT é possível pontuar: a precisão e rapidez com que as medidas são realizadas; a possibilidade de uma investigação tridimensional direta da estrutura óssea; e a preservação da amostra para outras possíveis investigações, uma vez que se trata de um método não destrutivo (MULLER et al., 1998; LIU et al., 2016). A criação de sistemas de escaneamento *in vivo* também permitiu investigações longitudinais que são especialmente valiosas na detecção de mudanças precoces induzidas por alterações metabólicas e medicamentos no osso trabecular (BOYD et al., 2006; PERILLI et al., 2010). Entretanto a Micro-CT também apresenta limitações, dentre elas, a pouca sensibilidade na visualização de

tecidos moles. Assim, a investigação do tecido vascular, por exemplo, somente é possível com a utilização de contrastes específicos (CLARK; BADEA, 2014).

3. Proposição

3. PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar o efeito do tratamento de longa duração com altas doses de AZ no osso esponjoso da mandíbula e fêmur de ratos Wistar.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para contemplar o objetivo geral, esse estudo foi dividido em duas investigações com os seguintes objetivos específicos:

Investigação I

1. Conhecer por meio de análise microtomográfica a arquitetura do osso esponjoso da mandíbula e região proximal do fêmur nos grupos experimental (submetido ao tratamento com AZ) e controle.

Investigação II

1. Conhecer por meio de análise microtomográfica e análise histológica as alterações induzidas na microarquitetura óssea e vasculatura do osso alveolar no grupo experimental (submetido ao tratamento com AZ) em relação ao controle.
 2. Correlacionar os achados microtomográficos com a histomorfometria óssea e vascular.
-

4. Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (protocolo 022/2014). Doze ratos Wistar albino (*Rattus Norvegicus*), com 12 semanas de idade, pesando $343,1\text{g} \pm 26,0\text{g}$, do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo foram alojados em gaiolas coletivas (com três animais em cada gaiola) revestidas com maravalha esterilizada. As gaiolas foram mantidas em uma sala com circulação de ar (15 trocas / hora) e umidade (45-75%) controlada, temperatura de 22°C e iluminação artificial com fotoperíodo de 12 horas. Alimentação sólida e água foram disponibilizadas *ad libitum* para os animais durante todo o experimento.

4.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

A administração de medicação foi realizada seguindo o protocolo descrito por Maahs, et al. (2011) para induzir OMAB em ratos Wistar (Maahs et al., 2011). Após duas semanas de aclimação, ratos foram pesados, numerados e divididos aleatoriamente em dois grupos: Experimental (ZA, Zometa, Novartis, São Paulo) 0,6 mg / kg) e Controle (CTR; 0,9% de cloreto de sódio no mesmo volume do Grupo experimental). As soluções foram administradas por via intraperitoneal em cinco doses a cada 28 dias. A saúde física e a atividade dos animais foram verificadas diariamente e a massa corporal foi registrada antes de cada administração para determinar a dose de solução para cada animal (Figura 4).

Cento e cinquenta dias após o início do tratamento, os animais foram sedados e a eutanásia foi realizada com uma solução de cloridrato de cetamina (Dopalen® - Ketamine Hydrochloride 10 ml e nasedan® - Xylazine 10 ml, CEVA, São Paulo, Brasil). As hemimandíbulas e fêmures foram desconectados e colocados em tubos *Eppendorf* de 1,5 ml com 10% de formalina.

Figura 4- Protocolo de administração intraperitoneal das soluções de acordo com Maahs, et al (2011). Os animais receberam cinco doses das soluções, administradas a cada 28 dias.

4.2 INVESTIGAÇÃO I - ANÁLISE DO IMPACTO DO AZ NA MICROESTRUTURA ÓSSEA DO FÊMUR E DA MANDÍBULA

4.2.1 Micro-CT

As hemimandíbulas e os fêmures direitos foram escaneados usando um sistema de Micro-CT de alta resolução (Skyscan 1174®; Bruker, Bélgica). Os parâmetros de escaneamento foram ajustados a 50 kVp, 800 μ A, giro de 180 ° com um ângulo de rotação de 0,8 °, 1024x1300 pixels e voxel de 14 μ m³. Um filtro de alumínio de 0,5 mm foi usado para minimizar os efeitos de endurecimento do feixe e reduzir o ruído nas imagens. O *software* NRecon® (versão 1.6.5, Bruker, Bélgica) foi usado para a reconstrução das imagens com tamanho de voxel isotrópico de 14 μ m³. As imagens foram manualmente registradas utilizando a plataforma MeVisLab 2.8.1 (MeVis Medical Solutions AG, Alemanha; Figura 5) e em seguida automaticamente registradas utilizando o *software* (MTM Scaffold, KU Leuven, Bélgica; Figura 6). O *software* CTAnalyzer® (Bruker, Bélgica) foi utilizado para a segmentação das imagens e o cálculo de parâmetros morfométricos tridimensionais. Na mandíbula o volume de interesse (VOI) foi delimitado incluindo todo o osso esponjoso na região do primeiro e segundo molares e excluindo outras regiões anatômicas (canal mandibular, osso cortical, ligamento periodontal e dentes; Figura 7). No fêmur, o VOI foi delimitado, incluindo o osso

esponjoso da região da metáfise. As estruturas dentro do VOI foram segmentadas usando um algoritmo de *global threshold*.

Figura 5- Imagem da interface da plataforma MeVisLab 2.8.1 (MeVis Medical Solutions AG, Alemanha) demonstrando o registro manual das imagens. A. Posição espacial das imagens logo após a importação (vermelho- amostra usada como referência para o registro; verde- amostra a ser reposicionada). B. imagens sobrepostas após o registro espacial.

Figura 6- Imagem da interface do *software* MTM Scaffold (KU Leuven, Bélgica) demonstrando o alinhamento espacial das imagens após o registro automático baseado na informação contida em cada voxel. Nota-se o posicionamento espacial semelhante das amostras.

Figura 7- Reconstruções tridimensionais mostrando o osso esponjoso segmentado dentro dos volumes de interesse selecionados para a morfometria óssea na mandíbula (vermelho) e no fêmur (azul). Na mandíbula toda a região de osso esponjoso foi selecionada excluindo apenas os reparos anatômicos na região do primeiro e segundo molar. No fêmur o osso esponjoso da metáfise foi selecionado.

Os parâmetros morfométricos tridimensionais foram calculados automaticamente de acordo com o sistema da *American Society for Bone and Mineral Research* (SBMR; Tabela 2) (DEMPSTER et al., 2013) e agrupados de acordo com termos clínicos para a avaliação do osso esponjoso (VAN DESSEL et al., 2016): (1) **Quantidade de osso**: densidade do volume ósseo (BV / TV), densidade da superfície óssea (BS / TV) e espessura trabecular (Tb.Th); e (2) **Estrutura óssea**: número trabecular (Tb.N); Separação trabecular (Tb.Sp), densidade de conectividade (Conn.Dn;), porcentagem de porosidade total (Po [tot]), padrão trabecular (Tb.Pf) e índice do modelo de estrutura (SMI).

Tabela 2: Parâmetros morfométricos avaliados de acordo com o sistema de nomenclatura da American Society for Bone and Mineral Research. ^a Parâmetros avaliados na investigação I; ^b Parâmetros avaliados na investigação II (na investigação II foram selecionados somente os parâmetros que poderiam ser calculados na Micro-CT e histomorfometria).

Parâmetros morfométricos	Sigla	Unidade	Descrição
Densidade volumétrica	óssea BV/TV ^{a,b}	%	Razão entre o volume do osso segmentado e o volume total da região de interesse
Superfície volume ósseo	óssea/ BS/TV ^{a,b}	mm ² /mm ³	Razão entre a superfície do osso segmentado para o volume ósseo segmentado
Espessura trabecular	Tb.Th ^{a,b}	1/mm	Média da espessura das trabéculas de toda a estrutura. A espessura local de cada voxel do osso é definido como o diâmetro da esfera maior que se encaixa no interior do objeto e encerra o voxel tridimensionais
Número trabecular	Tb.N ^{a,b}	Mm	Medida do número médio de trabéculas transversais por unidade de comprimento
Separação trabecular	Tb.Sp ^{a,b}	Mm	Distância média entre as trabéculas, avaliadas pelos espaços ósseos
Fator de padrão trabecular	Tb.Pf ^a	1/mm	Parâmetro de conectividade inversa
Índice de modelo estrutural	SMI ^a		Indicador da estrutura trabecular. SMI perto de 0 com placas paralelas e de 3 para hastes cilíndricas
Porosidade Total	Po(tot) ^a	%	Volume de porosidade total
Densidade de Conectividade	Conn.Dn ^a	1/μm ³	Medida do grau de conectividade das trabéculas, mensurada pelo número de conexões trabeculares por unidade de volume

Fonte: Adaptado de IMADA (2015).

4.3 INVESTIGAÇÃO II- ANÁLISE DO IMPACTO DO AZ NA ESTRUTURA ÓSSEA E ÁREA VASCULAR DO OSSO ALVEOLAR

Para a segunda parte da investigação, dez amostras de hemimandíbula (cinco AZ e cinco Controles) de animais submetidos ao protocolo experimental e de escaneamento de Micro-CT descritos acima foram selecionadas para análise dos parâmetros morfométricos tridimensionais (Micro-CT) e análise histológica.

4.3.1 Histologia

As amostras foram lavadas em água corrente durante 24 horas e desmineralizadas em EDTA aquoso (pH 7,2, solução contendo 4,13% de Titriplex III (Merck®, Alemanha) e 0,44% de hidróxido de sódio (LabSynth®, Diadema, Brasil) diluído em água destilada à temperatura ambiente, por um período de aproximadamente 40 dias com mudanças semanais da solução. As amostras foram lavadas e secas com álcool 70 e álcool absoluto (LabSynth®, Diadema, Brasil) e limpas em xileno (LabSynth®, Diadema, Brasil). A seguir foram infiltradas e incorporadas em blocos de parafina e resina (Histosec, Merck®, Alemanha). Os blocos foram submetidos a secções longitudinais alternadas de 5µm de espessura (espaçamento de 100 µm) e as secções foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE).

4.3.1.1 Análise Estereológica

Foram selecionadas oito secções de cada amostra para análise estereológica do osso. As imagens microscópicas digitais com ampliação de cinco vezes foram obtidas usando uma câmera digital (AxioCam HRc®, Carl Zeiss MicroImaging, GmbH, Gottingen, Alemanha) acoplada a um microscópio óptico Axioskop 2® (Carl Zeiss Light Microscope, GmbH, GmbH, Gottingen, Alemanha) previamente calibrado. As medições da Área Total (At), da Área Óssea (Ao) e do comprimento do perímetro ósseo (Po) foram realizadas usando AxioVision Imaging 4.8 (Carl Zeiss MicroImaging, GmbH, Gottingen, Alemanha). O osso alveolar entre as raízes do primeiro molar inferior foi avaliado (Figura 8). Os parâmetros morfométricos foram calculados a partir das medidas primárias de área e perímetro utilizando o método estereológico

proposto por Parfitt, et al (1983), seguindo a nomenclatura SBMR (Dempster et al., 2013; Parfitt et al., 1983; Tabela 3 :

Tabela 3- Parâmetros morfométricos avaliados de acordo com o sistema de nomenclatura da American Society for Bone and Mineral Research e fórmulas de cálculo estereológico a partir de medidas bidimensionais (área total (At) área óssea (Ao) e perímetro ósseo; Po) propostos por Parfitt et al (1983).

Parâmetros morfométricos	Fórmula (Parfitt et al., 1983)
BV/TV	$(Ao / At) 100$
BS / TV	$(Po / At) 1,199$
Tb.Th	$(2 / 1.99) (Ao / Po)$
Tb.N	$(1.99 / 2) (Po / At)$
Tb.Sp	$(2 / 1.99) (At-Ao) / Po)$

As medidas foram agrupadas de acordo com os termos clínicos descritos anteriormente para Micro-CT (Tabela 2): **(1) Quantidade de osso:** densidade do volume ósseo (BV / TV), densidade da superfície óssea (BS / TV) e espessura trabecular (Tb.Th); **(2) Estrutura óssea:** número trabecular (Tb.N); separação trabecular (Tb.Sp) (Van Dessel et al., 2016).

Figura 8- Delimitação manual da área total e área de espaços medulares durante a histomorfometria óssea na região entre as raízes mesial e distal do primeiro molar. A partir dessas medidas a área total, área óssea e perímetro ósseo foram calculados. Aumento: 5X.

4.3.1.2 Histomorfometria Vascular

As mesmas oito seções histológicas de cada amostra foram avaliadas para a quantificação da área dos vasos sanguíneos. Um campo em uma ampliação de vinte vezes para cada seção foi escolhido de forma padronizada para incluir o osso alveolar entre as raízes mesial e distal do primeiro molar na região do terço cervical e médio das raízes. Este campo foi selecionado para excluir a região do ápice das raízes para evitar qualquer possível alteração na vasculatura induzida por possível inflamação odontogênica. A área total (TA) e a área dos vasos sanguíneos (VA) foram delimitadas manualmente e calculadas automaticamente usando AxioVision Imaging 4.8 (Carl Zeiss MicroImaging, GmbH, Gottingen, Alemanha; Figura 9). A partir dessas medidas, a área percentual dos vasos sanguíneos ($VA / TA; \%$) foi calculada usando a fórmula $(VA/TA)100$.

Figura 9- Histomorfometria da área dos vasos em relação à área total do campo analisado. A área vascular foi manualmente delimitada. Aumento: 20X.

4.3.2 Micro-CT

A análise dos parâmetros morfométricos tridimensionais foi realizada também na mesma região investigada na histologia. Para isso, após a reconstrução no *software* NRecon® (versão 1.6.5, Bruker, Bélgica), as imagens foram espacialmente alinhadas às fotomicroscopias das lâminas histológicas correspondentes no *software* DataViewer (Bruker, Bélgica). O *software* CTanalyzer® (Bruker, Bélgica) foi utilizado para a segmentação das imagens e o cálculo de parâmetros morfométricos tridimensionais. O VOI foi delimitado incluindo somente o osso alveolar entre as raízes mesial e distal do primeiro molar (Figura 10);

As estruturas dentro do VOI foram segmentadas usando um algoritmo de *global threshold* automático (Figura 11). Para que fosse possível a direta comparação com a histomorfometria somente foram avaliados os parâmetros que pudessem ser calculados em ambos os métodos (Quadro 1). Os parâmetros morfométricos tridimensionais foram calculados automaticamente seguindo a nomenclatura da American Society for Bone and Mineral Research (SBMR) (Dempster et al., 2013) e agrupados de acordo com termos clínicos para a avaliação da qualidade óssea já descritos na análise histológica (quantidade de osso e estrutura óssea) (Van Dessel et al., 2016):

Figura 10- Reconstrução tridimensional demonstrando o osso esponjoso segmentado dentro do VOI (verde) usado na quantificação dos parâmetros morfométricos na Micro-CT na investigação II. Foi selecionada a região entre as raízes mesial de distal do primeiro molar para a análise.

Figura 11- Seleção do volume de interesse e segmentação para análise das imagens no *software* CTAnalyzer® (Bruker, Bélgica). A. Imagem original; B. seleção da Região de Interesse (vermelho); C. *threshold* - binarização da imagem e segmentação do osso trabecular (branco) para a análise.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos resultados das duas investigações, utilizou-se o software estatístico IBM SPSS® (Versão 20.0, IBM, Nova York, EUA). A significância estatística aceita foi $\alpha = 0,05$. O teste One way ANOVA foi utilizado para estimar o efeito do tratamento com ZA no osso alveolar e para comparar as alterações entre o grupo experimental e o grupo controle. Modelos lineares foram utilizados para agregar variáveis conforme descrito acima para cada investigação em **(1) Quantidade de osso** e **(2) Estrutura óssea**. O teste de correlação de Pearson foi utilizado para investigar a relação entre as variáveis morfométricas calculadas na Micro-CT e histomorfometria e entre os valores de VA/TA e as variáveis morfométricas ósseas. Os dados quantitativos dos parâmetros Micro-CT e histomorfométricos são apresentados como médias e desvio-padrão em gráficos.

5. Resultados

5. RESULTADOS

Todos os animais toleraram bem o protocolo experimental e apresentaram ganho de massa corporal ao final do experimento com peso médio final de $456,0\text{g} \pm 25,6\text{g}$. Clinicamente, nenhum animal nos dois grupos apresentou lesões orais de OMAB na mandíbula no momento da eutanásia.

5.1 INVESTIGAÇÃO I

Na investigação I o VOI selecionado na mandíbula incluiu todo o osso mandibular esponjoso excluindo apenas os reparos anatômicos na região do primeiro e segundo molares. O tratamento com AZ apresentou um impacto significativo sobre a quantidade de osso esponjoso ($F = 17,17$; $p = 0,001$; $\eta^2_p = 0,86$) e a estrutura óssea ($F = 94,76$; $p > 0,001$; $\eta^2_p = 0,98$). O impacto na quantidade óssea reflete principalmente um aumento em BV/TV e Tb.Th induzido pela administração de AZ. O grupo teste apresentou BV/TV 17,5% maior ($F = 28,53$; $p > 0,001$; $\eta^2_p = 0,74$) e trabéculas mais espessas (Tb.Th; $F = 37,88$; $p > 0,001$; $\eta^2_p = 0,79$) que o grupo controle, entretanto não houve diferença significativa nos valores de BS/TV ($F = 3,81$; $p = 0,074$; $\eta^2_p = 0,27$) entre os dois grupos.

Em relação às alterações induzidas pelo tratamento com AZ na estrutura do osso esponjoso, o grupo teste apresentou trabéculas com estruturas mais próximas de placas (SMI; $F = 8,05$; $p = 0,018$; $\eta^2_p = 0,44$), trabéculas mais compactas ($\downarrow$ Tb. N; $F = 6,09$; $p = 0,033$; $\eta^2_p = 0,37$) e com diminuição significativa nos valores de Tb.Pf ($F = 15,20$; $p = 0,003$; $\eta^2_p = 0,60$) e Conn.Dn ($F = 28,53$; $p < 0,001$; $\eta^2_p = 0,74$). A redução significativa no tamanho médio dos espaços medulares ($\downarrow$ Tb.Sp; $F = 21,62$; $p = 0,001$; $\eta^2_p = 0,68$) e porosidade óssea (Po (tot) $F = 28,53$; $p < 0,001$; $\eta^2_p = 0,74$) em relação ao grupo de controle também foram observados (Figuras 12 e 14).

Figura 12- Medidas morfométricas tridimensionais (Micro-CT) do osso medular mandibular do grupo controle e AZ obtidas na investigação I. Asterisco: $p < 0.05$.

Na metáfise do fêmur o tratamento com AZ também apresentou impacto na quantidade ($F = 44,11$; $p < 0,001$; $\eta^2_p = 0,94$) e estrutura ($F = 76,95$; $p < 0,001$; $\eta^2_p = 0,98$) do osso esponjoso. O grupo teste apresentou BV/TV 46,0% maior ($F = 92,87$; $p < 0,001$; $\eta^2_p = 0,90$) e trabéculas mais espessas (Tb.Th; $F = 150,34$; $p < 0,001$; $\eta^2_p = 0,93$) além de estrutura trabecular menos complexa ($\downarrow$ BS/TV; $F = 18,23$; $p = 0,002$; $\eta^2_p = 0,64$). Em relação às alterações na estrutura do osso esponjoso, o grupo teste apresentou estruturas trabeculares convexas próximas a cilindros (SMI; $F = 43,61$; $p < 0,001$; $\eta^2_p = 0,62$), marcadamente mais compactas ($\downarrow$ Tb. N; $F = 59,43$; $p < 0,001$; $\eta^2_p = 0,85$), diminuição significativa nos valores de Tb.Pf ($F = 16,94$; $p = 0,002$; $\eta^2_p = 0,62$) e Conn.Dn ($F = 66,43$; $p < 0,001$; $\eta^2_p = 0,86$), com menor separação entre as trabéculas ($\downarrow$ Tb.Sp; $F = 53,06$; $p < 0,001$; $\eta^2_p = 0,84$) e menor porosidade ($\downarrow$ Po (tot) $F = 92,87$; $p < 0,001$; $\eta^2_p = 0,90$) em comparação ao controle (Figuras 13 e 14).

Figura 13- Medidas morfométricas tridimensionais (Micro-CT) do osso medular na metáfise do fêmur do grupo controle e AZ obtidas na investigação I. Asterisco: $p < 0,05$.

Figura 14- Reconstruções tomográficas das mandíbulas e fêmures do grupo controle (a e c) e AZ (b e d). Nota-se o aumento da densidade do osso trabecular e diminuição dos espaços medulares no grupo AZ tanto na mandíbula quanto no fêmur.

5.2 INVESTIGAÇÃO II

5.2.1 Micro-CT

O cálculo morfométrico tridimensional (Micro-CT) do VOI na região do osso alveolar entre as raízes mesial e distal do primeiro molar, mostrou que o tratamento com AZ

apresentou impacto significativo na quantidade óssea ($F = 26,35$; $p = 0,002$; $\eta^2_p = 0,94$) com aumento de 10,4% em BV / TV ($F = 72,35$; $p < 0,001$ $\eta^2_p = 0,91$) e aumento significativo na espessura trabecular (TbTh; $F = 5,68$; $p = 0,049$; $\eta^2_p = 0,44$) . Não foi observado impacto significativo na estrutura óssea ($F = 2,44$; $p = 0,167$; $\eta^2_p = 0,44$), no entanto, uma diminuição significativa no tamanho dos espaços medulares foi observada ($\downarrow$ Tb.Sp $F = 5,66$; $p = 0,049$ $\eta^2_p = 0,44$) no grupo AZ (Figura 14).

Figura 15- Investigação II- Medidas morfométricas tridimensionais (Micro-CT) na região de osso alveolar entre as raízes mesial e distal do primeiro molar mandibular direito no grupo controle e AZ. Asterisco $p < 0,05$.

5.2.2 Histologia

5.2.2.1 Achados descritivos

Na análise histológica, a mesma área de interesse analisada na Micro-CT (região entre as raízes mesial e distal do primeiro molar) foi selecionada. Devido à anatomia curva das raízes do primeiro molar, em uma amostra de controle não foi possível selecionar a região de interesse para a análise histomorfométrica. Por isso, esta amostra foi excluída.

Os achados histológicos foram consistentes com as observações da Micro-CT e um aumento da área óssea juntamente com a diminuição do tamanho dos canais nutritivos e das áreas medulares foram observados no grupo AZ (Figura 15).

Figura 16- Reconstruções tomográficas espacialmente alinhadas às fotomicroscopias do grupo controle (a e b) e grupo AZ (c e d). A presença de osso mais compacto e espaços de medulares menores foram observados no grupo AZ (c e d) em comparação com o grupo controle (a e b). Aumento: 2X

Os espécimes obtidos do grupo AZ também foram caracterizados por um aumento da deposição osteóide com linhas de reversão (basofílicas) proeminentes. A presença de tecido conjuntivo dentro dos canais nutritivos e vasos sanguíneos congestionados (com hemácias em seu interior) também foram observados no grupo AZ. Áreas ósseas não vitais não foram observadas tanto no grupo AZ quanto nos controles (Figura 4).

Figura 17- Fotomicroscopia em maior aumento da região do terço cervical e médio entre as raízes mesial e distal do primeiro molar inferior no grupo controle e AZ. A) Controle: presença de vasos sanguíneos (asteriscos) e canais nutritivos maiores, linhas reversão finas e discretas (pontas de flechas); B) ZA: presença de canais nutritivos menores com mais tecido conjuntivo no seu interior (flechas), vasos sanguíneos menores, congestos (asteriscos) e linhas de reversão irregulares basofílicas mais espessas (pontas de flechas). Aumento: 20X

5.2.2.2 Histomorfometria

O cálculo estereológico revelou que o tratamento com AZ teve um impacto significativo na quantidade do osso alveolar ($F = 13,06$; $p = 0,008$; $\eta^2_p = 0,88$) com aumento de 9,5% em BV / TV ($F = 48,84$; $p < 0,001$ $\eta^2_p = 0,87$) e na estrutura óssea ($F = 21,22$; $p = 0,002$; $\eta^2_p = 0,87$) com uma diminuição significativa em Tb.Sp ($F = 17,43$; $p = 0,004$; $\eta^2_p = 0,71$). A histomorfometria da área dos vasos sanguíneos revelou que o tratamento com AZ induziu uma redução significativa em VA / TA ($F = 27,01$; $p = 0,001$; $\eta^2_p = 0,79$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em relação às outras variáveis investigadas (Figura 17).

Figura 18- Investigação II- Medidas histomorfométricas do osso alveolar entre as raízes mesial e distal do primeiro molar mandibular nos grupos controle e AZ. Asterisco: $p < 0,05$

Na avaliação histomorfométrica, uma forte correlação negativa foi observada entre os valores de VA/TA e BV/TV ($r = -0,898$; $p = 0,001$) e uma forte correlação positiva foi observada entre os valores de VA/TA e Tb.Sp ($r = 0,947$; $p < 0,001$). No que diz respeito à correlação entre VA/TA e os parâmetros avaliados na Micro-CT, uma forte correlação negativa

foi observada entre VA/TA e BV/TV ($r = -0,885$; $p = 0,002$), entretanto não foi observada correlação significativa entre VA/TA e Tb.Sp ($r = 0,658$; $p = 0,054$).

Figura 19- Gráficos de dispersão demonstrando as correlações entre VA/TA, BV/TV e TB.Sp na investigação II. A. Correlações obtidas na análise histomorfométrica; B. Correlações obtidas na análise com Micro-CT.

5.2.3 Correlação entre as técnicas de Micro-CT e histomorfometria óssea

O teste de correlação de Pearson demonstrou uma forte correlação positiva entre a Micro-CT e a Histomorfometria para BV/TV ($r = 0,976$; $p < 0,001$) e Tb.Sp ($r = 0,814$; $p = 0,008$). Não foram observadas correlações significativas para as outras variáveis morfológicas.

6. Discussão

6. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento de longa duração e alta dose de AZ na microarquitetura óssea e vasculatura do osso alveolar de ratos Wistar por meio de análise microtomográfica e histológica. Além disso, a fim de identificar possíveis alterações sítio-específicas induzidas pelo AZ na remodelação óssea, as alterações na microarquitetura do osso esponjoso foram investigadas na mandíbula e no fêmur. Os resultados demonstraram que os animais tratados com AZ apresentaram o osso alveolar entre as raízes mesial e distal do primeiro molar mandibular marcadamente mais denso ($\uparrow$ BV/TV) com espaços de medulares e canais nutritivos de tamanho reduzido ($\downarrow$ Tb.Sp), levando a uma redução significativa na porcentagem da área vascular no osso alveolar. Esses achados sustentam a hipótese de que a supressão da remodelação óssea induzida por altas doses cumulativas dos BF pode induzir esclerose óssea e comprometimento da vascularização, desempenhando um papel importante na fisiopatologia da OMAB (ALLEN; BURR, 2009; CARMAGNOLA et al., 2013; KIM et al., 2017).

Considerando que os BF acumulam no tecido ósseo e que o risco de OMNB aumenta com o período de administração desses fármacos, é importante conhecer seu efeito na homeostasia óssea em longo prazo (BAMIAS et al., 2005; RUSSELL, 2011; RUGGIERO et al., 2014; KHAN et al., 2015). Nesta investigação, um protocolo que corresponde a um longo período de administração na espécie animal investigada foi utilizado. Na idade adulta um dia de vida dos ratos Wistar equivaleria a 34,8 dias em humanos, no modelo utilizado o tempo de duração do experimento seria equivalente a 14,3 anos de tratamento em humanos (SENGUPTA, 2013). Embora o tempo de administração equivalente seja significativamente maior que o tempo médio de tratamento associado à OMAB em humanos, o protocolo experimental utilizado foi estabelecido por Maahs et al. (2011) atendendo o critério clínico de diagnóstico de OMAB recomendado pela *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* (exposição do osso maxilar que não cicatrize após oito semanas, com história de terapia com BF e ausência de radioterapia) o que o torna relevante para o estudo de OMAB (RUGGIERO et al., 2009; SHARMA et al., 2013). Esse protocolo foi escolhido devido à sua capacidade de induzir uma alta taxa de OMAB (80-100%) quando combinado com exodontia em ratos Wistar sem a adição de nenhum outro fator de risco (MAAHS et al., 2011; ZEN FILHO, 2014). Essa característica o torna especialmente relevante para a investigação do efeito do AZ na

homeostasia óssea e sua contribuição na fisiopatologia da OMAB. No entanto, nesta investigação o trauma local não foi induzido nos animais investigados. Desta forma, as alterações da estrutura óssea alveolar induzidas pelo AZ que poderiam constituir o primeiro passo no desenvolvimento da OMAB em animais saudáveis foram descritas. Em relação à via de administração utilizada, embora a administração intraperitoneal induza níveis plasmáticos mais baixos que a endovenosa (utilizada em humanos) trata-se de uma via segura e de fácil manuseio para a espécie estudada (MAAHS et al., 2011).

Em concordância com os achados desta investigação, estudos anteriores demonstraram que a administração de AZ aumentou a densidade óssea na mandíbula (JABBOUR et al., 2014; CORDOVA et al., 2016). No entanto, esses estudos avaliaram o volume ósseo no alvéolo pós-extração de modelos animais de OMAB, onde o processo de reparo, a inflamação e a própria doença podem influenciar os resultados (JABBOUR et al., 2014; CORDOVA et al., 2016).

A região entre as raízes do primeiro molar representa a região mais próxima das raízes do dente, cercada pelo ligamento periodontal, onde forças mastigatórias podem induzir maiores taxas de remodelação (ALLEN; BURR, 2008; HSU et al., 2016). Assim, esta região foi selecionada para relacionar os achados histológicos e microtomográficos e apenas os parâmetros de morfologia óssea que poderiam ser avaliados em ambas as análises foram calculados. Nesta região, observou-se uma redução significativa no tamanho dos espaços de medulares e dos canais nutritivos ($\downarrow$ Tb.Sp; $p < 0,05$) e um aumento significativo da quantidade óssea ($\uparrow$ BV / TV; $p < 0,05$) no grupo AZ em ambas as técnicas.

Acrescentando a estes achados, no exame histológico, várias linhas de reversão mais irregulares e mais espessas estavam presentes no grupo AZ. Um padrão semelhante de linhas de reversão também foi relatado nas biópsias de pacientes com OMAB (KIM et al., 2017). Essas características são provavelmente o resultado da contínua deposição de osso não-lamelar, enquanto a reabsorção óssea está comprometida pelo tratamento com o bisfosfonato (KIM et al., 2017). A deposição contínua de tecido ósseo neoformado pode levar à diminuição do tamanho dos canais nutritivos e obliteração progressiva dos mesmos, diminuindo a vascularização e dificultando a resposta a traumas teciduais e infecções (CARMAGNOLA et al., 2013; KIM et al., 2017). Além disso, o osso depositado durante o tratamento com BF apresenta em sua estrutura o bisfosfonato ligado a hidroxapatita e provavelmente induzirá a apoptose dos osteoclastos no momento em que sua reabsorção for requerida (KIM et al., 2017).

Na amostra investigada o aumento do volume ósseo foi fortemente correlacionado a diminuição da densidade da área vascular. O grupo AZ apresentou área vascular

significativamente menor que o grupo controle ($p=0,001$). Na análise histológica qualitativa, poucos e pequenos vasos sanguíneos cercados por tecido conjuntivo foram observados dentro dos canais nutritivos no grupo AZ. Além disso, vasos sanguíneos congestos apresentando hemácias em seu interior estavam presentes no grupo AZ e não no controle. Os vasos congestos são um indicativo de uma menor perfusão sanguínea no momento da fixação das amostras em formalina. Em concordância com esses achados, outras investigações relataram que AZ diminui a área dos vasos sanguíneos, ramificação e conectividade vascular na mandíbula (BORKE et al., 2015; GUEVARRA et al., 2015). O pamidronato também já foi associado à redução do fluxo sanguíneo na tíbia e no fêmur em ratos (KAPITOLA; ZAK, 1998). A redução do fluxo sanguíneo e da área vascular pode interferir na capacidade óssea para responder ao trauma e infecção bacteriana.

Não está claro se a diminuição da vasculatura induzida pelos BF está exclusivamente relacionada a um efeito antiangiogênico ou permanece como um efeito secundário da diminuição da taxa de remodelação óssea (BORKE et al., 2015). Allen, et al. (2009) pontuaram que, uma vez que o fluxo sanguíneo está diretamente relacionado à remodelação óssea, a diminuição da remodelação poderia induzir uma menor demanda metabólica o que levaria a uma remodelação vascular e diminuição da perfusão sanguínea (ALLEN; BURR, 2009). A diferenciação e atividade dos osteoclastos também estão diretamente ligadas à estimulação da angiogênese. Assim, a supressão dos osteoclastos também poderia induzir a diminuição da angiogênese no microambiente ósseo (CACKOWSKI et al., 2010).

Os efeitos inibitórios dos BF na angiogênese e na atividade das células endoteliais tem sido amplamente relatados (MAAHS et al., 2011; WEHRHAN et al., 2011; MOZZATI et al., 2013; BORKE et al., 2015). Entretanto resultados conflitantes em diferentes estudos suscitam a discussão sobre o papel do efeito antiangiogênico dos BF na fisiopatologia da OMAB (ALLEN; BURR, 2009; REID; CORNISH, 2012; BORKE et al., 2015). O aumento na expressão gênica do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) tem sido reportado em modelos animais de OMAB (BORKE et al., 2015; FERREIRA, 2015). A expressão de VEGF é diretamente influenciada por mediadores da inflamação (SIVARAJ; ADAMS, 2016). Assim, um aumento da expressão de VEGF em comparação aos controles em modelos de OMAB após exodontias provavelmente é justificado pelo atraso no processo de cicatrização, a presença de lesão de OMAB e a manutenção do estímulo inflamatório.

Curiosamente, Ferreira (2015) também observou um aumento significativo da expressão gênica de VEGF no osso alveolar de animais submetidos ao mesmo protocolo

medicamentoso reportado nesta investigação, que não foram submetidos à exodontia e não apresentaram OMAB. No osso normal, a hipóxia celular é um importante regulador da angiogênese óssea e consequentemente de VEGF (SIVARAJ; ADAMS, 2016). Os resultados da presente investigação levantam a hipótese de que a redução da área vascular observada é uma consequência da esclerose óssea induzida pelo AZ. Desta maneira, na presença de tecido ósseo menos vascularizado, o fator induzido por hipóxia (FIH) estimularia o aumento na expressão gênica de VEGF o que justificaria os achados de Ferreira (2015) (FERREIRA, 2015).

Em relação à metodologia utilizada na primeira parte deste estudo para análise da microarquitetura óssea e vasculatura, a Micro-CT permite a investigação não destrutiva tridimensional direta da estrutura trabecular com alta confiabilidade quando comparada com as medidas histomorfométricas padrão. No entanto, uma limitação deste método reside na incapacidade de acessar mudanças celulares e a necessidade de contraste na investigação da vasculatura (CLARK; BADEA, 2014; LIU et al., 2016). Assim, uma análise histológica complementar foi realizada. A maioria das investigações publicadas compara diretamente os dados da Micro-CT e histologia sem um processamento de imagem adicional para minimizar os erros induzidos pela seleção de diferentes regiões de interesse em cada método (DIAS et al., 2015; LIU et al., 2016). Neste estudo, o alinhamento espacial das imagens de Micro-CT com os cortes histológicos correspondentes foi realizado antes das análises.

Fortes correlações positivas foram observadas entre os métodos para as variáveis BV/TV ($r=0,976$; $p<0,001$) e TB.Sp ($r=0.814$; $p=0,008$). Os outros parâmetros não apresentaram correlações significativas. Liu, et al (2016) avaliaram a concordância entre a Micro-CT e a histomorfometria na avaliação da arquitetura óssea da mandíbula e tíbia de ratos ovariectomizados e controles. Os autores observaram fortes correlações positivas entre os dois métodos em todos os parâmetros avaliados (BV/TV; BS/TV; Tb.N; Tb.Th; Tb.Sp). A concordância entre os métodos aumentou na medida em que o tamanho do voxel da Micro-CT se aproximou da espessura dos cortes histológicos (LIU et al., 2016). No estudo aqui reportado, o tamanho discrepante do voxel da Micro-CT (14 μ m) em relação à espessura dos cortes histológicos (5 μ m) pode ter contribuído para a discrepância em algumas variáveis. O tamanho do voxel maior que a espessura dos cortes histológicos impediu a visualização dos pequenos canais nutritivos na Micro-CT e induziu uma superestimação do conteúdo mineral dentro do VOI. Desta maneira, a ausência de correlação significativa entre Tb.Sp avaliada na Micro-CT e VA/TA ($r= 0,658$; $p= 0,054$) foi provavelmente influenciada pela resolução da imagem (tamanho do voxel) na Micro-CT.

Outro fator que pode ter contribuído para as discrepâncias supracitadas é seleção do *threshold* (determinação da escala de cinza na Micro-CT). A atenuação dos raios X através da estrutura não homogênea não é uniforme e podem existir trabéculas de diferentes densidades que exigem seleções individuais de *threshold* para cada amostra no momento da quantificação (DIAS et al., 2015). No sistema Micro-CT Skyscan, o *threshold* é determinado em dois momentos: um quando as imagens são reconstruídas a partir dos arquivos de aquisição (neste estudo todos os arquivos foram reconstruídos seguindo os mesmos valores no histograma); e outro quando as imagens são binarizadas durante a segmentação (DIAS et al., 2015). Neste estudo, para a segmentação utilizamos o “*global threshold*”. Este sistema baseia-se na análise do histograma, na qual um valor da unidade de Hounsfield é escolhido, e voxels acima desse valor são marcados como osso e abaixo como “não-osso” (WAARSING; DAY; WEINANS, 2004). A determinação manual do *threshold* pode fazer com que o limite do que é quantificado como osso na Micro-CT seja menos preciso que na Histomorfometria (DIAS et al., 2015).

As taxas de absorção de BF no osso e resposta à terapia variam de acordo com a duração do tratamento, a dose e o osso investigado (WEN et al., 2011; CHAPURLAT et al., 2013). Os maxilares, devido às mobilizações dentárias constantes, extrações e infecções periodontais, apresentam alta taxa de remodelação óssea, na qual a grande quantidade de superfície de reabsorção ativa favorece a ligação dos BF (BERTOLDO; SANTINI; LO CASCIO, 2007; WEN et al., 2011). Esta característica adicionada às doses elevadas e a longa duração do tratamento recebido pelos pacientes tratados por doenças malignas esqueléticas poderia induzir a um aumento da acumulação de BF nos maxilares (BERTOLDO; SANTINI; LO CASCIO, 2007). Com o objetivo de investigar as alterações estruturais do osso maxilar em relação os ossos longos, as alterações na microarquitetura óssea induzidas pelo AZ foram avaliadas na mandíbula e fêmur de ratos Wistar.

Os resultados demonstraram que o tratamento de longa duração e altas doses de AZ impactou significativamente a quantidade de osso e estrutura trabecular tanto na mandíbula quanto na metáfise do fêmur. De maneira geral o grupo tratado com AZ apresentou osso mais denso ($\uparrow$ BV/TV; $\uparrow$ TB.Th), com estrutura menos complexa ($\downarrow$ Tb.N), mais compacta ($\downarrow$ Tb.Sp; $\downarrow$ Po(Tot) e com trabéculas mais conectadas ($\downarrow$ Tb.Pf) na mandíbula e fêmur. A diminuição significativa de BS/TV no fêmur do grupo AZ também reflete a diminuição na complexidade da estrutura trabecular nesse sítio. Em relação ao padrão de formato das trabécula (SMI), na mandíbula um padrão mais próximo à placas foi observado, enquanto que no fêmur um formato cilíndrico esteve presente. Os valores negativos de SMI observados no fêmur indicam a presença de estruturas côncavas, próprias de ossos mais densos (SALMON et al., 2015). Do

mesmo modo, os valores negativos de Tb.Pf observados indicam a presença de estruturas côncavas, mais conectadas, circundando espaços medulares fechados (HAHN et al., 1992).

Curiosamente, tanto na mandíbula quanto no fêmur o grupo tratado com AZ apresentou menor densidade de conectividade entre as trabéculas ($\downarrow$ Conn.Den). É esperado que em estruturas trabeculares mais densas maior densidade de conectividade seja observada (IMADA, 2015). Entretanto, é importante enfatizar que, o parâmetro Conn.Dn mede o número de conexões trabeculares por unidade de volume (IMADA, 2015). Na amostra investigada, o AZ induziu a corticalização do osso esponjoso, diminuindo significativamente o número de trabéculas. Assim é justificável que também um menor número de conexões entre as trabéculas seja observado.

A evidência de que os BF provocam alterações estruturais semelhantes na mandíbula e no fêmur, induzindo uma arquitetura esclerótica em ambos os sítios confirma a contribuição de fatores locais da cavidade oral na fisiopatologia da OMAB. Ao contrário dos ossos longos, a mandíbula e maxila são constantemente expostas a microrganismos patogênicos presentes na cavidade oral (HANSEN et al., 2007; VERMEER;RENDERS; EVERTS, 2016). A presença de infecção periodontal tem sido reportada em 84% dos casos de OMAB e a história de trauma local (ex. exodontias) em 60% (WOO;HELLSTEIN; KALMAR, 2006).

A seleção do volume de interesse para a investigação II se deu de maneira a incluir o maior volume de osso trabecular na região dos molares na mandíbula e na metáfise do fêmur. Para isso da seleção do VOI na mandíbula e da seleção e no fêmur, um alinhamento espacial preliminar foi realizado em todas as amostras. Os VOIs foram selecionados e adaptados individualmente para cada amostra. Na mandíbula somente foram excluídos os reparos anatômicos e o osso cortical na região. No fêmur um VOI inicial determinado em uma amostra do grupo controle foi importado e adaptado aos limites da cortical de cada amostra.

Algumas limitações deste estudo devem ser pontuadas. Esta investigação foi focada na avaliação tridimensional (Micro-CT) *ex vivo* e na avaliação histológica das alterações do microambiente ósseo em Ratos Wistar. Desta forma, os animais não foram submetidos à Micro-CT antes da administração do medicamento, o que possibilitaria uma comparação longitudinal dos efeitos do AZ. Um acompanhamento *in vivo* que poderia correlacionar as alterações vasculares e ósseas induzidas pelos BF no microambiente ósseo deve ser encorajado. No fêmur, apenas as alterações na morfologia óssea foram avaliadas por meio da Micro-CT. A investigação das alterações histológicas é importante para o entendimento do efeito dos BF na homeostasia óssea e deve ser realizada. Além disso, as técnicas aqui aplicadas são apenas capazes de medir a morfologia do tecido. Uma vez que o fornecimento de sangue de osso é

influenciado tanto pela morfologia e função dos vasos, futuras investigações devem combinar métodos capazes de abordar essas duas características (LAFAGE-PROUST et al., 2015).

Os resultados deste estudo fornecem evidências de que a alta dose cumulativa de BF é capaz de induzir mudanças na arquitetura do osso esponjoso na ausência de qualquer fator agravante local ou sistêmico em ratos Wistar. No entanto, a inexistência de lesões OMAB na amostra investigada confirma a natureza multifatorial da fisiopatologia OMAB (HUANG et al., 2015; KHAN et al., 2015). Estudos futuros devem considerar a investigação de parâmetros morfométricos ósseos na investigação das mudanças na arquitetura do osso trabecular em pacientes em alto risco para OMAB (submetidos à terapia com altas doses endovenosas de BF contendo nitrogênio por longos períodos de tempo) (KHAN et al., 2015).

7. Conclusões

7. CONCLUSÕES

O tratamento de longa duração com altas doses de AZ apresentou impacto significativo na estrutura óssea da mandíbula e do fêmur. Em ambos os ossos, o grupo tratado com AZ apresentou osso trabecular denso, com estrutura menos complexa e diminuição dos espaços medulares. Estes resultados sugerem que as alterações induzidas pelo AZ na arquitetura do osso esponjoso são semelhantes na mandíbula e fêmur. A redução significativa da porcentagem de área vascular foi observada no grupo AZ e apresentou forte correlação com o aumento da densidade óssea na mandíbula. A redução da perfusão sanguínea, na presença de trauma local, pode prejudicar o reparo tecidual e a resposta à infecção e, conseqüentemente, contribuir para a formação das lesões de OMAB. Quando comparados os dados dos parâmetros avaliados na Micro-CT e histomorfometria na mandíbula, apenas BV/TV e Tb.Sp apresentaram forte correlação positiva.

8. Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-ID, M. H., et al. "Bis-phosphy jaws" - high and low risk factors for bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. **J Craniomaxillofac Surg.** v.36, n. 2,2008, p. 95-103.

AGARWAL, S., et al. Risk of atypical femoral fracture with long-term use of alendronate (bisphosphonates) : a systemic review of literature. **Acta Orthop Belg.** v.76, n. 5,2010, p. 567-571.

AGHALOO, T. L., et al. Osteonecrosis of the jaw in a patient on Denosumab. **J Oral Maxillofac Surg.** v.68, n. 5,2010, p. 959-963.

ALLEN, M. R. The effects of bisphosphonates on jaw bone remodeling, tissue properties, and extraction healing. **Odontology.** v.99, n. 1,2011, p. 8-17.

ALLEN, M. R.; D. B. BURR. Mandible matrix necrosis in beagle dogs after 3 years of daily oral bisphosphonate treatment. **J Oral Maxillofac Surg.** v.66, n. 5,2008, p. 987-994.

ALLEN, M. R.; D. B. BURR. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. **J Oral Maxillofac Surg.** v.67, n. 5 Suppl,2009, p. 61-70.

ALLEN, M. R., et al. Morphological assessment of basic multicellular unit resorption parameters in dogs shows additional mechanisms of bisphosphonate effects on bone. **Calcif Tissue Int.** v.86, n. 1,2010, p. 67-71.

ALLEN, M. R., et al. Cancer treatment dosing regimens of zoledronic acid result in near-complete suppression of mandible intracortical bone remodeling in beagle dogs. **J Bone Miner Res.** v.25, n. 1,2010, p. 98-105.

ALTUNDAL, H.; O. GUVENER. The effect of alendronate on resorption of the alveolar bone following tooth extraction. **Int J Oral Maxillofac Surg.** v.33, n. 3,2004, p. 286-293.

BAMIAS, A., et al. Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. **J Clin Oncol.** v.23, n. 34,2005, p. 8580-8587.

BARBA-RECREO, P., et al. Zoledronic acid - related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. **J Craniomaxillofac Surg.** v.42, n. 6,2014, p. 744-750.

BELLIDO, T.; L. I. PLOTKIN. Novel actions of bisphosphonates in bone: preservation of osteoblast and osteocyte viability. **Bone**. v.49, n. 1,2011, p. 50-55.

BERTOLDO, F., et al. Bisphosphonates and osteomyelitis of the jaw: a pathogenic puzzle. **Nat Clin Pract Oncol**. v.4, n. 12,2007, p. 711-721.

BOIVIN, G., et al. Influence of remodeling on the mineralization of bone tissue. **Osteoporos Int**. v.20, n. 6,2009, p. 1023-1026.

BOIVIN, G. Y., et al. Alendronate increases bone strength by increasing the mean degree of mineralization of bone tissue in osteoporotic women. **Bone**. v.27, n. 5,2000, p. 687-694.

BORKE, J. L., et al. Correlation of changes in the mandible and retina/choroid vasculature of a rat model of BRONJ. **J Craniomaxillofac Surg**. v.43, n. 7,2015, p. 1144-1150.

BOYD, S. K., et al. Monitoring individual morphological changes over time in ovariectomized rats by in vivo micro-computed tomography. **Bone**. v.39, n. 4,2006, p. 854-862.

BROUWERS, J. E., et al. Bone degeneration and recovery after early and late bisphosphonate treatment of ovariectomized wistar rats assessed by in vivo micro-computed tomography. **Calcif Tissue Int**. v.82, n. 3,2008, p. 202-211.

CAKOWSKI, F. C., et al. Osteoclasts are important for bone angiogenesis. **Blood**. v.115, n. 1,2010, p. 140-149.

CARMAGNOLA, D., et al. Histological findings on jaw osteonecrosis associated with bisphosphonates (BONJ) or with radiotherapy (ORN) in humans. **Acta Odontol Scand**. v.71, n. 6,2013, p. 1410-1417.

CARPENTER, A. M. Stereology. Definition and historic background. **J Histochem Cytochem**. v.27, n. 11,1979, p. 1535.

CASTRO, L. F., et al. Bifosfonatos (BFs) como transportadores osteotrópicos no planejamento de fármacos dirigidos. **Química Nova**. n. 2004, p. 456-460.

CHAPURLAT, R. D., et al. Effect of oral monthly ibandronate on bone microarchitecture in women with osteopenia-a randomized placebo-controlled trial. **Osteoporos Int**. v.24, n. 1,2013, p. 311-320.

CLARK, D. P.; C. T. BADEA. Micro-CT of rodents: state-of-the-art and future perspectives. **Phys Med**. v.30, n. 6,2014, p. 619-634.

COLEMAN, R., et al. Adjuvant bisphosphonate treatment in early breast cancer: meta-analyses of individual patient data from randomised trials. **Lancet**. v.386, n. 10001,2015, p. 1353-1361.

COMPSTON, J. Pathophysiology of atypical femoral fractures and osteonecrosis of the jaw. **Osteoporos Int**. v.22, n. 12,2011, p. 2951-2961.

CONTE, P.; V. GUARNERI. Safety of intravenous and oral bisphosphonates and compliance with dosing regimens. **Oncologist**. v.9 Suppl 4, n. 2004, p. 28-37.

CORDOVA, L. A., et al. Severe compromise of preosteoblasts in a surgical mouse model of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. **J Craniomaxillofac Surg**. v.44, n. 9,2016, p. 1387-1394.

CREMERS, S.; S. PAPAPOULOS. Pharmacology of bisphosphonates. **Bone**. v.49, n. 1,2011, p. 42-49.

DALLE CARBONARE, L., et al. Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. **Micron**. v.36, n. 7-8,2005, p. 609-616.

DE SOUZA FALONI, A. P., et al. Jaw and long bone marrows have a different osteoclastogenic potential. **Calcif Tissue Int**. v.88, n. 1,2011, p. 63-74.

DEMPSTER, D. W., et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. **J Bone Miner Res**. v.28, n. 1,2013, p. 2-17.

DIAS, D. R., et al. Agreement between Histomorphometry and Microcomputed Tomography to Assess Bone Microarchitecture of Dental Implant Sites. **Clin Implant Dent Relat Res**. v.17, n. 4,2015, p. 732-741.

DIEL, I. J., et al. Improved quality of life after long-term treatment with the bisphosphonate ibandronate in patients with metastatic bone disease due to breast cancer. **Eur J Cancer**. v.40, n. 11,2004, p. 1704-1712.

EID, A.; J. ATLAS. The role of bisphosphonates in medical oncology and their association with jaw bone necrosis. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**. v.26, n. 2,2014, p. 231-237.

FAVIA, G., et al. Histologic and histomorphometric features of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: an analysis of 31 cases with confocal laser scanning microscopy. **Bone**. v.45, n. 3,2009, p. 406-413.

FDA, F. A. D. A. Background document for meeting of Advisory Committee for reproductive health drugs and drug safety and risk management advisory committee. **Center for Drug Evaluation and Research**. n. 2011, p. 17-20.

FELDKAMP, L. A., et al. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. **J Bone Miner Res**. v.4, n. 1,1989, p. 3-11.

FERREIRA, G. Z. (2015). **Avaliação do reparo ósseo alveolar e femoral em um modelo animal tratado com ácido zoledrônico**, Universidade de São PauloDisponível em: Acesso em: 2015.

FLORA, L., et al. The long-term skeletal effects of EHDP in dogs. **Metab Bone Dis Relat Res**. v.3, n. 4-5,1981, p. 289-300.

FUNG, P., et al. Time to onset of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a multicentre retrospective cohort study. **Oral Dis**. n. 2016, p.

GARCIA, C. M., et al. Osteomyelitis of the mandible in a patient with osteopetrosis. Case report and review of the literature. **J Maxillofac Oral Surg**. v.12, n. 1,2013, p. 94-99.

GIANNOBILE, W. V., & NEVINS, M. (EDS.) (2011). Osteology guidelines for oral and maxillofacial regeneration: preclinical models for translational research.

GUEVARRA, C. S., et al. Vascular alterations in the sprague-dawley rat mandible during intravenous bisphosphonate therapy. **J Oral Implantol**. v.41, n. 2,2015, p. e24-29.

HAGIWARA, M., et al. Utilization of intravenous bisphosphonates in patients with bone metastases secondary to breast, lung, or prostate cancer. **Support Care Cancer**. v.22, n. 1,2014, p. 103-113.

HAHN, M., et al. Trabecular bone pattern factor--a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. **Bone**. v.13, n. 4,1992, p. 327-330.

HANSEN, T., et al. Actinomycosis of the jaws--histopathological study of 45 patients shows significant involvement in bisphosphonate-associated osteonecrosis and infected osteoradionecrosis. **Virchows Arch**. v.451, n. 6,2007, p. 1009-1017.

HANSEN, T., et al. Osteonecrosis of the jaws in patients treated with bisphosphonates - histomorphologic analysis in comparison with infected osteoradionecrosis. **J Oral Pathol Med**. v.35, n. 3,2006, p. 155-160.

HATORI, K., et al. Single and combined effect of high-frequency loading and bisphosphonate treatment on the bone micro-architecture of ovariectomized rats. **Osteoporos Int.** v.26, n. 1,2015, p. 303-313.

HOEFERT, S., et al. Importance of microcracks in etiology of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a possible pathogenetic model of symptomatic and non-symptomatic osteonecrosis of the jaw based on scanning electron microscopy findings. **Clin Oral Investig.** v.14, n. 3,2010, p. 271-284.

HSU, P. Y., et al. Cortical Bone Morphological and Trabecular Bone Microarchitectural Changes in the Mandible and Femoral Neck of Ovariectomized Rats. **PLoS One.** v.11, n. 4,2016, p. e0154367.

HUANG, Y. F., et al. Impact of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw on osteoporotic patients after dental extraction: a population-based cohort study. **PLoS One.** v.10, n. 4,2015, p. e0120756.

IMADA, T. S. N. **O efeito do Ácido Zoledrônico na microestrutura óssea analisado pela Micro-CT em mandíbulas de ratos Wistar.** Doutorado em Estomatologia e Biologia Oral Tese, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. 2015. Disponível em: www.teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25149/tde.../ThaisSumieNozuImada.pdf. Acesso em: 2015.

JABBOUR, Z., et al. Bisphosphonates inhibit bone remodeling in the jaw bones of rats and delay healing following tooth extractions. **Oral Oncol.** v.50, n. 5,2014, p. 485-490.

KAPITOLA, J.; J. ZAK. Effect of pamidronate on bone blood flow in oophorectomized rats. **Physiol Res.** v.47, n. 4,1998, p. 237-240.

KHAN, A. A., et al. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. **J Bone Miner Res.** v.30, n. 1,2015, p. 3-23.

KHOSLA, S., et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. **J Bone Miner Res.** v.22, n. 10,2007, p. 1479-1491.

KIM, S. M., et al. Histochemical observation of bony reversal lines in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.** v.123, n. 2,2017, p. 220-228.

KOMATSUBARA, S., et al. Long-term treatment of incadronate disodium accumulates microdamage but improves the trabecular bone microarchitecture in dog vertebra. **J Bone Miner Res.** v.18, n. 3,2003, p. 512-520.

KOMATSUBARA, S., et al. Suppressed bone turnover by long-term bisphosphonate treatment accumulates microdamage but maintains intrinsic material properties in cortical bone of dog rib. **J Bone Miner Res.** v.19, n. 6,2004, p. 999-1005.

KULAK, C. A.; D. W. DEMPSTER. Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. **Arq Bras Endocrinol Metabol.** v.54, n. 2,2010, p. 87-98.

KWON, J. W., et al. A Large National Cohort Study of the Association between Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaw in Patients with Osteoporosis: A Nested Case-control Study. **J Dent Res.** v.94, n. 9 Suppl,2015, p. 212S-219S.

LAFAGE-PROUST, M. H., et al. Assessment of bone vascularization and its role in bone remodeling. **Bonekey Rep.** v.4, n. 2015, p. 662.

LIU, H., et al. Bone micro-architectural analysis of mandible and tibia in ovariectomised rats: A quantitative structural comparison between undecalcified histological sections and micro-CT. **Bone Joint Res.** v.5, n. 6,2016, p. 253-262.

LIU, J., et al. Bisphosphonates and risk of subtrochanteric, femoral shaft, and atypical femur fracture: sensitivity and trim and fill studies. **Genet Test Mol Biomarkers.** v.18, n. 2,2014, p. 117-122.

MAAHS, M. P., et al. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats. **Head Neck.** v.33, n. 2,2011, p. 199-207.

MARX, R. E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **J Oral Maxillofac Surg.** v.61, n. 9,2003, p. 1115-1117.

MARX, R. E., et al. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. **J Oral Maxillofac Surg.** v.63, n. 11,2005, p. 1567-1575.

MASHIBA, T., et al. Suppressed bone turnover by bisphosphonates increases microdamage accumulation and reduces some biomechanical properties in dog rib. **J Bone Miner Res.** v.15, n. 4,2000, p. 613-620.

MASHIBA, T., et al. The effects of suppressed bone remodeling by bisphosphonates on microdamage accumulation and degree of mineralization in the cortical bone of dog rib. **J Bone Miner Metab.** v.23 Suppl, n. 2005, p. 36-42.

MASHIBA, T., et al. Effects of suppressed bone turnover by bisphosphonates on microdamage accumulation and biomechanical properties in clinically relevant skeletal sites in beagles. **Bone**. v.28, n. 5,2001, p. 524-531.

MIKSAD, R. A., et al. Quality of life implications of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. **Oncologist**. v.16, n. 1,2011, p. 121-132.

MOZZATI, M., et al. Oral mucosa produces cytokines and factors influencing osteoclast activity and endothelial cell proliferation, in patients with osteonecrosis of jaw after treatment with zoledronic acid. **Clin Oral Investig**. v.17, n. 4,2013, p. 1259-1266.

MULLER, R., et al. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. **Bone**. v.23, n. 1,1998, p. 59-66.

PARFITT, A. M., et al. Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. **J Clin Invest**. v.72, n. 4,1983, p. 1396-1409.

PAUTKE, C., et al. Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw: A minipig large animal model. **Bone**. v.51, n. 3,2012, p. 592-599.

PERILLI, E., et al. Detecting early bone changes using in vivo micro-CT in ovariectomized, zoledronic acid-treated, and sham-operated rats. **Osteoporos Int**. v.21, n. 8,2010, p. 1371-1382.

RECKER, R. R., et al. Effects of intravenous zoledronic acid once yearly on bone remodeling and bone structure. **J Bone Miner Res**. v.23, n. 1,2008, p. 6-16.

REID, I. R.; J. CORNISH. Epidemiology and pathogenesis of osteonecrosis of the jaw. **Nat Rev Rheumatol**. v.8, n. 2,2012, p. 90-96.

RENDERS, G. A., et al. Implications of high-dosage bisphosphonate treatment on bone tissue in the jaw and knee joint. **Calcif Tissue Int**. v.95, n. 5,2014, p. 436-445.

RUGGIERO, S. L., et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw - 2009 update. **Aust Endod J**. v.35, n. 3,2009, p. 119-130.

RUGGIERO, S. L., et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. **J Oral Maxillofac Surg**. v.72, n. 10,2014, p. 1938-1956.

RUGGIERO, S. L., et al. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. **J Oral Maxillofac Surg.** v.62, n. 5,2004, p. 527-534.

RUSSELL, R. G. Bisphosphonates: the first 40 years. **Bone.** v.49, n. 1,2011, p. 2-19.

RUSSELL, R. G., et al. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. **Osteoporos Int.** v.19, n. 6,2008, p. 733-759.

SALMON, P. L., et al. Structure Model Index Does Not Measure Rods and Plates in Trabecular Bone. **Front Endocrinol (Lausanne).** v.6, n. 2015, p. 162.

SANCHEZ, A.; R. BLANCO. Osteonecrosis of the jaw (ONJ) and atypical femoral fracture (AFF) in an osteoporotic patient chronically treated with bisphosphonates. **Osteoporos Int.** n. 2016, p.

SENGUPTA, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. **Int J Prev Med.** v.4, n. 6,2013, p. 624-630.

SHARMA, D., et al. Animal models for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws--an appraisal. **Oral Dis.** v.19, n. 8,2013, p. 747-754.

SIVARAJ, K. K.; R. H. ADAMS. Blood vessel formation and function in bone. **Development.** v.143, n. 15,2016, p. 2706-2715.

SWAIN, M. V.; J. XUE. State of the art of Micro-CT applications in dental research. **Int J Oral Sci.** v.1, n. 4,2009, p. 177-188.

VAN DESSEL, J., et al. Quantification of bone quality using different cone beam computed tomography devices: Accuracy assessment for edentulous human mandibles. **Eur J Oral Implantol.** v.9, n. 4,2016, p. 411-424.

VASCONCELOS, A. C., et al. Laboratory methods and biomarkers in the evaluation of bisphosphonate effects on body tissues: a literature review. **J Oral Pathol Med.** v.42, n. 8,2013, p. 577-586.

VERMEER, J. A., et al. Osteonecrosis of the Jaw-a Bone Site-Specific Effect of Bisphosphonates. **Curr Osteoporos Rep.** v.14, n. 5,2016, p. 219-225.

VIEILLARD, M. H., et al. Effects of high dose of zoledronic acid on superficial vascular network of membranous bone sites: an intravital study on rat calvarium. **Osteoporos Int.** v.21, n. 11,2010, p. 1919-1925.

WAARSING, J. H., et al. An improved segmentation method for in vivo microCT imaging. **J Bone Miner Res.** v.19, n. 10,2004, p. 1640-1650.

WEHRHAN, F., et al. Differential impairment of vascularization and angiogenesis in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw-related mucoperiosteal tissue. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v.112, n. 2,2011, p. 216-221.

WEINSTEIN, R. S. True strength. **J Bone Miner Res.** v.15, n. 4,2000, p. 621-625.

WEN, D., et al. Anatomic site variability in rat skeletal uptake and desorption of fluorescently labeled bisphosphonate. **Oral Dis.** v.17, n. 4,2011, p. 427-432.

WOO, S. B., et al. Narrative [corrected] review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. **Ann Intern Med.** v.144, n. 10,2006, p. 753-761.

YONEDA, T., et al. Antiresorptive agent-related osteonecrosis of the jaw: Position Paper 2017 of the Japanese Allied Committee on Osteonecrosis of the Jaw. **J Bone Miner Metab.** n. 2016, p.

ZEN FILHO, E. V. **Análise molecular e microscópica do reparo ósseo de alvéolos dentários após exodontia em um modelo de osteonecrose dos maxilares induzida pelo ácido zoledrônico em ratos Wistar.** Mestrado em Estomatologia e Biologia Oral Dissertação, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. 2014. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25149/tde-08092014-103848/>. Acesso em: 2014.

ZHANG, J., et al. Efficacy of intravenous zoledronic acid in the prevention and treatment of osteoporosis: a meta-analysis. **Asian Pac J Trop Med.** v.5, n. 9,2012, p. 743-748.