**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

Thaís Sumie Nozu Imada

**O efeito do Ácido Zoledrônico na microestrutura óssea
analisado pela Micro-CT em mandíbulas de ratos *Wistar***

**Bauru
2015**

Thaís Sumie Nozu Imada

**O efeito do Ácido Zoledrônico na microestrutura óssea analisado
pela Micro-CT em mandíbulas de ratos *Wistar***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas.

Área de concentração: Estomatologia

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

Versão Corrigida

**Bauru
2015**

Im1e Imada, Thaís Sumie Nozu
O efeito do Ácido Zoledrônico na microestrutura
óssea analisado pela Micro-CT em mandíbulas de
ratos *Wistar*/Thaís Sumie Nozu Imada. – Bauru,
2015.

123p. : il. ; 31cm.

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

Orientadora: 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 em animais da FOB-USP
Protocolo nº: 03/2013
Data: 15/04/2013

DEDICATÓRIA

*A todos que de alguma forma colaboraram
com este trabalho*

AGRADECIMENTOS

“O teu êxito depende muitas vezes do êxito das pessoas que te rodeiam”

Benjamín Franklin

A Deus! Por sempre me iluminar e me guiar pelos melhores caminhos e por me acompanhar em todos os momentos, sejam eles os melhores ou os mais difíceis. Obrigada por todas as bênçãos e pela vida maravilhosa que me contemplou.

Aos meus pais, Keiko e Antônio, minha base, meus exemplos de vida, por todo amor e dedicação incondicional. Muito obrigada por sempre me incentivarem e me apoiarem em minhas escolhas fazendo o possível e o impossível para a realização dos meus sonhos. Devo tudo o que sou e o que alcancei a vocês. Muito Obrigada! Amo vocês acima de tudo nessa vida. Deixo aqui minha gratidão e reconhecimento eternos!

Ao meu namorado Marcelo, por todo apoio e paciência na etapa final da minha tese. Agradeço por toda a companhia e companheirismo, por todos os finais de semana e noites “de castigo” para que eu pudesse me concentrar na minha tese, por me aturar em todos os meus momentos de estresse e mau humor, sempre me mostrando o lado mais positivo de tudo. Sou muito feliz por te ter em minha vida.

A minha sogra, Eliane, pela solicitude de fazer a correção do português da minha tese e pelo carinho com que sempre tem me tratado.

A Faculdade de Odontologia de Bauru que me acolheu em toda a minha formação.

Aos Professores da disciplina de Estomatologia e Cirurgia, Prof^a Dr^a Izabel Regina Fischer Rubira-Bullen, Prof^a. Dr^a Ana Lúcia, Prof. Dr. José Humberto Damante, Prof. Dr. Luiz Eduardo M Chinellato, Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos, Prof. Dra. Cássia Fischer Rubira, Prof. Dr. Eduardo Gonçalves, Prof. Dr. Eduardo Sant'ana, Prof. Dr. Osny Ferreira Junior, e Prof. Dr. Renato Yaedú, meus mestres e inspiradores, por todos os conhecimentos transmitidos e pelo ótimo convívio. Cada um de vocês da sua forma contribuiu imensamente para minha formação, com certeza levarei cada um de vocês no coração.

Agradeço especialmente a Prof^a Dr^a Izabel Regina Fischer Rubira-Bullen, minha querida orientadora, que desde a graduação tem me ajudado sempre com muita paciência e carinho. Obrigada por todas as críticas e elogios ao longo desses anos que me fizeram crescer muito como pessoa e profissionalmente. Sou muita grata por confiar em mim e em meu trabalho. Muito obrigada por tudo professora!

Agradeço também ao Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos, o padrinho desta pesquisa. Muito obrigada pela dedicação e paciência dedicadas a esta pesquisa. O professor me co-orientou, dando todo o suporte e apoio necessário para que eu realizasse esta pesquisa.

À Prof^a Dr^a Reinhilde Jacobs, minha orientadora do exterior (e agora peço licença para escrever o agradecimento em inglês). It was really an honor and privilege to have a chance to work with such a renowned researcher. Thank you for all the advices, patience and consideration. Teacher enabled me experiences that I would've never imagined. Thank you very much.

My colleagues in the OIC, OMFS IMPATH Research Group, KULeuven. People from all over the world with the common aim of contributing to global research. With you I learned various cultures and made true friends. I will carry with love the time we shared in our lab and really hope that one day our reunion would be possible.

Gostaria de agradecer também aos meus amigos brasileiros residentes da Bélgica por todo o conforto e carinho que me ajudaram na minha estada na Bélgica. Espero que possamos nos reencontrar algum dia.

Aos colegas da Especialização, Mestrado e do Doutorado pela convivência especial que tivemos durante esses anos e pelos trabalhos desenvolvidos. Construimos boas histórias e amizade e também dividimos inseguranças e angústias, sempre recompensadas por inúmeras alegrias e vitórias. Guardo com muito carinho cada um de vocês. Obrigada por fazerem parte da minha vida, admiro muito vocês e dedico grande parte dessa conquista a vocês. Especialmente ao colega Edson Virgílio Zen Filho, pela colaboração nesta pesquisa.

Ao Departamento de Estomatologia e Cirurgia por propiciarem o material e equipamentos para essa pesquisa e às pessoas essenciais que fazem parte dele. Aos funcionários da FOB pela dedicação ao trabalho prestado, em especial a Marília, Cris e Luciana, Alexandre, Andréa, Fernanda e Roberto, vocês são essenciais para o funcionamento dela, muito obrigada pelo carinho e prontidão em me ajudar e pela amizade e risadas de sempre!

Aos funcionários do Biotério, Erasmo e Luís, por toda ajuda e dedicação com o cuidado dos ratos.

Ao Departamento de Endodontia, especialmente aos Prof. Dr. Marco Hungáro Duarte e Prof. Dr. Clóvis Monteiro Bramante, e ao aluno Ronald Ordínola Zapata que possibilitaram os escaneamentos da nossa amostra.

Ao Prof. Dr. José Roberto Lauris, pela ajuda na estatística deste trabalho.

A minha turma XLIV por toda a cumplicidade, companheirismo e diversão nos tempos de graduação e até hoje.

A CAPES pelo auxílio recebido com a bolsa de doutorado e a bolsa sanduíche.

E a todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para a realização desta pesquisa, Muito Obrigada!

*“A pedra preciosa não pode ser polida sem fricção,
nem o homem aperfeiçoado sem provação”*

Confúcio

RESUMO

Os bisfosfonatos são medicamentos amplamente e efetivamente utilizados para o tratamento de doenças osteolíticas. Entretanto, na cavidade oral, é de particular relevância, pois possuem como efeito adverso a osteonecrose dos maxilares induzida pelo uso de bisfosfonatos. Sua etiopatogenia ainda não é bem estabelecida, os métodos de detecção são insatisfatórios e as terapias recomendadas são por vezes, medidas paliativas e ineficazes. Pouco ainda é sabido sobre o efeito do Ácido Zoledrônico na microestrutura óssea, portanto, propusemo-nos a realizar um estudo em modelo animal que analisasse o trabeculado ósseo da mandíbula através da Micro-CT. Foram utilizados 24 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, *Wistar*), com 12 semanas de vida, divididos em 2 grupos: grupo controle (cloreto de sódio 0,9%) e grupo ácido zoledrônico (ácido zoledrônico 0,6mg/kg). As substâncias foram administradas via intraperitoneal a cada 28 dias em um total de 5 doses. Após 150 dias do início do experimento, foi realizada a eutanásia dos animais e então as amostras foram preparadas e escaneadas (Skyscan 1174) para análise da microestrutura óssea através da Micro-CT. O teste “t-student” demonstrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em todos os fatores: volume ósseo, densidade óssea, fator de padrão trabecular, índice de modelo estrutural, espessura trabecular, separação trabecular, porosidade total exceção de número de trabéculas e volume tecidual, demonstrando que há alterações significativas na estrutura trabecular pelo uso de bisfosfonatos. O grupo medicado com ácido zoledrônico comparado ao grupo controle demonstrou trabéculas mais espessas, menos separadas e com menores ligações.

Descritores: Osteonecrose dos Maxilares induzida pelo uso de Bisfosfonatos, Bisfosfonatos, Osteonecrose, Micro-CT, micro estrutura óssea, osso trabecular.

ABSTRACT

Bisphosphonates are widely and effectively drugs used for the treatment of osteolytic disorders. However, in the oral cavity, this situation is of particular relevance as it can lead to bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws. Its etiopathogenesis is still not established, detection methods are unsatisfactory and recommended therapies are sometimes palliative and often ineffective. Little is known about the effect of zoledronic acid on the quality of trabecular bone, therefore, we proposed to conduct a study in an animal model to examine the trabecular bone of the jaw through the Micro-CT. 24 male rats were used (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar), with 12 weeks old, divided into 2 groups: control group (sodium chloride 0.9%) and group with zoledronic acid (zoledronic acid 0.6 mg / kg). The substances were administered intraperitoneally every 28 days for a total of 5 doses. After 150 days from the beginning of the experiment, the animals were sacrificed and then the samples were prepared and scanned (Skyscan 1174) for analysis of the bone microstructure through Micro-CT. The "t-student" test demonstrated statistically significant differences ($p<0.05$) in all factors: bone volume, osseous density, trabecular pattern, structure model index, trabecular thickness, trabecular separation, total porosity except trabecular number and tissue volume, demonstrating that there are significant changes in the trabecular structure of the bisphosphonates. Zoledronic Acid compared to control group shows thicker, less separate and lower connected trabeculae.

Keywords: BRONJ, Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws, Bisphosphonates, Osteonecrosis, Micro - CT, bone microarchitecture, trabecular bone

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1 - Estrutura química do PI e BF. Em destaque vermelho a diferença do átomo de oxigênio, na fórmula do PI e do átomo de carbono central ligado à cadeia R1 e R2, na fórmula BF.....26
- Figura 2 - Aspectos radiográficos na OMAB progressivamente. A: normal; B: esclerose envolvendo a margem alveolar acompanhada pelo espessamento da lâmina dura; C: esclerose difusa podendo ocasionar a invasão e diminuição do diâmetro do canal mandibular.42
- Figura 3 - A: seleção de radiografia panorâmica magnificado mostrando periodonto normal, flechas enfatizando a integridade da lâmina dura, espaço periodontal e crista alveolar. B: recorte de radiografia panorâmica magnificado de paciente sob uso de BF há 5 anos. Flecha branca evidenciando a osteoclerose da margem alveolar e flecha preta evidenciando o espessamento do ligamento periodontal. C: recorte de radiografia panorâmica magnificado de paciente sob 6 anos de uso de BF, observa-se progressão de lesão mista na região do alvéolo de extração (flecha fina) e esclerose progressiva do ligamento periodontal (flecha grossa).....43
- Figura 4 - Reformatação da TCFC axial (A) e reformatação panorâmica obtidas com o Scanora 3D® demonstrando espessamento da cortical óssea e aumento da densidade medular focal na região de mandíbula esquerda.....45
- Figura 5 - Reformatação da TCFC coronal (A), sagital (B), axial (C) e reconstrução tridimensional (D) obtidas com o Scanora 3D® demonstrando extensa região de necrose óssea. Centralmente, sequestro ósseo bem delimitado evidente, envolvendo o teto do canal mandibular.....46
- Figura 6 - Reformatação da TCFC coronal (A), sagital (B), axial (C) e reconstrução tridimensional (D) obtidas com o Scanora 3D® demonstrando extensa área necrótica acompanhado de fratura mandibular.46
-
-

Figura 7	- Princípio da tecnologia μ CT. O tubo microfocal emite 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. Desse modo, é realizada uma varredura completa que envolve um conjunto de projeções sob diferentes rotações do objeto.	49
Figura 8	- Soluções utilizadas. A) Cloreto de sódio 0,9% e B) Zometa (Ácido zoledrônico) 4mg/100ml.....	62
Figura 9	- Organograma da administração das soluções	62
Figura 10	- Mandíbulas desarticuladas com tecido mole removido. A) Vista lateral vestibular ; B) Vista lateral lingual	63
Figura 11	- Radiografias dos grupos CO (A) e AZ (B). Observar discreto aumento da radiopacidade periapical e discreto espessamento da lamina dura no GAZ.....	64
Figura 12	- Mandíbulas seccionadas, 1cm anteriormente e posteriormente aos molares. A) Vista lateral vestibular; B) Vista lateral lingual.	65
Figura 13	- Mandíbula seccionada, embebida em formol 10% em tubo eppendorf posicionada o escaneamento da μ CT no interior do microtomógrafo	65
Figura 14	- Scanner 1174 da Skyscan utilizado na pesquisa	66
Figura 15	- Programa Nrecon para reconstrução dos volumes tomográficos; A) realizado a seleção axial da área a ser analisada; B) Ajuste de micro desalinhamento; C) Seleção da suavização adequada	66
Figura 16	- Interface do programa MIRIT para padronização espacial da amostra nos três planos. A) Posição inicial após importação dos espécimes. Observa-se dois espécimes diferentes em posições distintas (um em tons de cinza e outro em alaranjado); B) Sobreposição dos diferentes espécimes, proporcionando a padronização espacial.....	67
Figura 17	- Interface do programa MIRIT demonstrando o resultado após a padronização espacial de duas amostras distintas. Posicionamento muito similar em todos os planos axial, sagital e coronal, respectivamente.	67

Figura 18 - Interface do programa CtAn	68
Figura 19 - A) Primeiro ROI com a área máxima de osso trabecular excluindo o molar, incisivos, osso cortical e canal mandibular (CM); B) ROI final, adequado a todas as amostras para permitir a análise padronizada com o mesmo ROI em ambos os grupos (em vermelho).	69
Figura 20 - Imagem sagital da μ CT nas 3 diferentes janelas do programa CtAn: A) Imagem original; B) Seleção do ROI (em vermelho); C) Imagem binarizada	70
Figura. 21 - Imagens sagitais da μ CT (original, seleção do VOI, segmentação e resultado binário) da mandíbula na região periapical do primeiro molar de CO e AZ mostrando redução do espaço de medula óssea na região entre as raízes.....	73
Figura 22 - O modelo 3D do volume da área analisada, a partir de, respectivamente: A) o GCO e B) GAZ mostrando aparente mais osteosclerose. Em vermelho evidencia-se o ROI	74

- GRÁFICOS

Gráfico 1 - Valores dos grupos CO e AZ para volume tecidual (TV).....	75
Gráfico 2 - Valores dos grupos CO e AZ para volume ósseo (BV)	75
Gráfico 3 - Valores dos grupos CO e AZ para densidade óssea volumétrica (BV/TV)	76
Gráfico 4 - Valores dos grupos CO e AZ para superfície óssea/ volume ósseo (BS/BV).....	76
Gráfico 5 - Valores dos grupos CO e AZ para fator de padrão trabecular (Tb.Pf)	77
Gráfico 6 - Valores dos grupos CO e AZ para índice de modelo estrutural (SMI)	77
Gráfico 7 - Valores dos grupos CO e AZ para espessura trabecular (Tb.Th)	78
Gráfico 8 - Valores dos grupos CO e AZ para número trabecular (Tb.N)	78
Gráfico 9 - Valores dos grupos CO e AZ para separação trabecular (Tb.Sp)	79
Gráfico 10- Valores dos grupos CO e AZ para porosidade total (Po(tot)	79
Gráfico 11- Valores dos grupos CO e AZ para densidade de Conectividade (Conn.Dn)	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de BF disponíveis, nome comercial, via de administração, estrutura das cadeias R1 e R2 e potências relativas em comparação ao etidronato.	28
Tabela 2 - Classificação da OMAB pela AAOMS	34
Tabela 3 - Estágios clínicos da OMAB de acordo com Ruggiero et al. (2006).....	34
Tabela 4 - Estágios clínicos da OMAB de acordo com Wilde et al (2012)	34
Tabela 5 - Estágios clínicos e tomográficos da OMAB de acordo com Bedogni et al (2012) (BEDOGNI, A. et al., 2012)	47
Tabela 6 - Definição e descrição dos resultados da análise da μ CT para a microarquitetura do osso trabecular	53
Tabela 7 - Média e desvio padrão dos parâmetros morfométricos e valor de p para comparação entre grupos pelo teste de “t student”. Em vermelho $p < 0,05$, valores estatisticamente significativos	80

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

μCT	Micro-CT
AAOMS	American Association of Oral Maxillofacial Surgery
AZ	Ácido zoledrônico
BF	Bisfosfonatos
BS/BV	Superfície óssea/volume ósseo (<i>Bone surfasse/Bone volume</i>)
BV	Volume ósseo (<i>Bone volume</i>)
BV/TV	Densidade óssea volumétrica (<i>Bone volume fraction</i>)
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
Conn.Dn	Densidade de conectividade
DA	Grau de anisotropia
FOV	Campo de visão (<i>Field of view</i>)
GAZ	Grupo Ácido Zoledrônico
GCO	Grupo controle (mudar no texto)
HTM	Histomorfometria
IV	Intravenosa
MRI	Ressonância Magnética (<i>Magnetic Ressonance imaging</i>)
N-BF	Bisfosfonatos nitrogenados
OMAB	Osteonecrose dos maxilares associada ao de bisfosfonatos
ON	Osteonecrose
PI	Pirofosfato inorgânico
Po(tot)	Porosidade total
ROI	Região de interesse (<i>region of interest</i>)
S-BF	Bisfosfonatos simples/Bisfosfonatos não nitrogenados
SMI	Índice de modelo estrutural (<i>Structrual model index</i>)
Tb.N	Número trabecular (<i>Trabecular number</i>)
Tb.Pf	Padrão trabecular (<i>Trabecular</i>
Tb.Sp	Separação trabecular (<i>Trabecular separation</i>)
Tb.Th	Espessura trabecular (<i>Trabecular thickness</i>)
TCFC	Tomografia computadorizada de feixe cônico
TV	Volume tecidual (<i>Tissue volume</i>)

VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)
VO	Via oral
VOI	Volume de interesse (<i>volume of interest</i>)
Voxel	elementos volumétricos (<i>volume elements</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	Bisfosfonatos.....	25
2.1.1	Farmacocinética.....	28
2.1.2	Mecanismos de ação	29
2.1.3	Indicações	30
2.1.4	Efeitos Adversos	31
2.2	Osteonecrose dos maxilares induzida pelo uso de bisfosfonatos Incidência	32
2.2.1	Definição	32
2.2.2	Classificação	33
2.2.3	Incidência	35
2.2.4	Etiopatogênia	37
2.2.4.1	Supressão do turnover ósseo	38
2.2.4.2	Efeito Antiangiogênico.....	38
2.2.4.3	Toxicidade à mucosa de recobrimento.....	38
2.2.5	Diagnóstico e tratamento	39
2.2.5.1	Histopatológico.....	40
2.2.5.2	Exames de Imagem	40
2.2.5.2.1	Radiografias bidimensionais	42
2.2.5.2.2	Tomografia computadorizada de feixe cônico.....	43
2.2.6.1	Micro-CT	48
3	PROPOSIÇÃO	55

4	MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1	Seleção e análise da amostra	61
4.1.1	Grupos Experimentais.....	61
4.1.2	Procedimentos	62
4.1.3	Coleta e escaneamento das amostras	63
4.2	Análise estatística	70
5	RESULTADOS	71
6	DISCUSSÃO	81
6.1	Modelo Animal	83
6.2	Micro-CT	86
7	CONCLUSÕES	95
	REFERÊNCIAS	99
	ANEXOS	119

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos (BF) compõem uma classe de compostos sintéticos cuja estrutura química se assemelha com o pirofosfato inorgânico, regulador endógeno da mineralização óssea (KOBAYASHI, Y. et al., 2010). Quando administrados, são rapidamente removidos da corrente sanguínea e formam ligações de alta afinidade com a hidroxiapatita óssea muito difícil de serem quebradas (FLEISCH, H., 1998) e atenuam a atividade osteoclástica, desacelerando a remodelação esquelética e *turnover* ósseo (FLEISCH, H. A., 1997).

BF são amplamente utilizados para o tratamento de doenças osteolíticas como mieloma múltiplo, doença de Paget, osteoporose, hipercalcemia e metástases ósseas de neoplasias malignas (HOKUGO, A. et al., 2010). A administração mensal intravenosa (IV) de BF é o tratamento de escolha recomendado pela *American Society of Clinical Oncology* para tratamento de hipercalcemia e lesões osteolíticas metastáticas associadas à malignidade (RUGGIERO, S. L. et al., 2006; NOVINCÉ, C. M. et al., 2009; SCHEPER, M. A. et al., 2009). BF podem também ser administrados via oral (VO), principalmente para o cuidado da osteoporose.

A prescrição de BF para o tratamento de distúrbios do metabolismo ósseo teve um aumento significativo nos últimos anos, principalmente após a aprovação do uso do Ácido Zoledrônico (AZ) para o tratamento de mieloma múltiplo e metástases ósseas em 2002 pela *Food and Drug Administration* (2007), com mais de 3 milhões de pacientes medicados com BF ao redor do mundo (RUGGIERO, S. L. et al., 2006). De acordo com a *American Dental Association*, mais de 190 milhões de prescrições de BF têm sido feitas mundialmente. Este aumento trouxe consequências, como o aparecimento de um efeito adverso nunca antes descrito, a osteonecrose dos maxilares associada ao uso de BF (OMAB) (MARX, R. E., 2003).

A OMAB foi primeiramente descrita por Marx em 2003 (MARX, R. E., 2003) e posteriormente definida em 2007 por um consenso realizado pela *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeries* (HONOS, G. et al., 2007) como uma exposição óssea que persiste por mais de 8 semanas na cavidade oral em pacientes

sob tratamento com BF e que não foram submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço.

OMAB é um efeito adverso debilitante e doloroso. Infelizmente, é muito difícil de ser diagnosticada em seus estágios iniciais em radiografias convencionais (RUGGIERO, S. L. et al., 2006; BEDOGNI, A. et al., 2008) e não responde satisfatoriamente aos tratamentos convencionais, como debridamento cirúrgico, oxigenação hiperbárica e antibioticoterapia, ocorrendo até, em muitos casos, um aumento da região acometida frente à intervenção cirúrgica, afetando demasiadamente a qualidade de vida dos indivíduos. Atualmente, não há tratamento clínico nem métodos de diagnóstico concretamente instaurados e altamente efetivo para a OMAB. As terapias paliativas conservativa com analgesia e controle da progressão da doença são o tratamento recomendado (RUGGIERO, S. L. et al., 2006).

A ocorrência deste tipo de complicação é mais frequente em pacientes que fazem uso de BF Intravenoso (IV), geralmente o pamidronato e AZ para o tratamento de mieloma múltiplo e metástases ósseas de câncer de mama e próstata (FILLEUL, O. et al., 2010). A OMAB afeta aproximadamente 1-12% dos pacientes recebendo terapia BF IV (WOO, S. B. et al., 2006).

Ainda pouco se sabe sobre a etiopatogenia da OMAB, mas parece advir de uma complexa interação entre o metabolismo ósseo, trauma local, infecção e hipovascularização associadas ao uso de BF (ALLEN, M. R.; BURR, D. B., 2009). A teoria mais conhecida é o da supressão do *turnover* ósseo que explica a atuação dos BF sobre a reabsorção óssea principalmente ao inibirem o recrutamento e promoverem a apoptose dos osteoclastos, além de estimularem a atividade osteoblástica (ALLEN, M. R.; BURR, D. B., 2009). Pouco ainda é sabido sobre o efeito do AZ na qualidade do trabeculado ósseo, portanto, propomo-nos a realizar um estudo em modelo animal que analisasse o trabeculado ósseo da mandíbula através da Micro-CT.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bisfosfonatos

Os BF representam um grupo de químicos que foram, originalmente, em meados de 1865, utilizados nas indústrias de fertilizantes, óleo e têxtil como inibidor da corrosão e para impedir a formação de cristalizações na água, devido a sua propriedade de inibir a precipitação de carbonato de cálcio. Somente quase um século depois, em 1961, que seu uso foi voltado para o campo da medicina (FLEISCH, H., 1998; RUSSELL, R. G. et al., 1999).

As pesquisas nesse campo iniciaram-se quando Fleisch e Neuman em 1961 demonstraram que, os PI, substâncias encontradas na urina e no plasma sanguíneo, inibiam a formação e dissolução de fosfato de cálcio *in vitro* (FLEISCH, H. N. W., 1961), porém, não tinham influência sobre a mineralização e reabsorção óssea por serem degradados rapidamente pelas fosfatases locais (FLEISCH, H. M., J. RUSSEL RG, 1966; FLEISCH, H. R., RG. STRAUMANN F., 1966; FLEISCH, H., 1981). Estes estudos demonstraram que os PI são reguladores endógenos da mineralização óssea (RUSSELL, R. G. et al., 1999; WIDLER, L. et al., 2002). Entretanto, devido ao fato de os PI não possuírem ação sobre a reabsorção óssea e de serem rapidamente hidrolisados quando administrados via oral (V.O), fez com que os estudos fossem voltados para as substâncias análogas aos PI, que apresentassem características semelhantes, mas que não fossem tão rapidamente hidrolisados (FLEISCH, H., 1981; FLEISCH, H., 2002). Estes análogos dos PI, chamados na época disfosfonatos, hoje conhecidos como BF, começaram a ser utilizados em pesquisas como no desenvolvimento de agentes tópicos para inibição da formação de cálculos dentários (FRANCIS, M. D. et al., 1969).

Os BF são análogos sintéticos dos PI, mas diferentemente deles, possuem ligações geminais ao mesmo carbono (P-C-P), ao invés das P-O-P dos PI (FRANCIS, M. D. et al., 1969; FLEISCH, H., 2002). Esta ligação do carbono de O para o átomo C confere aos BF estabilidade ao calor, assim como resistência a hidrólise enzimática, inexistentes nos PI, aumentando sua meia vida e dessa forma,

possibilitando sua ação no metabolismo ósseo (LICATA, A. A., 1997; FLEISCH, H., 2002). Os BF também possuem 2 cadeias laterais R1 e R2 ligadas ao átomo de **C** central que permitem mudanças que alteram as características biológicas, químicas e toxicológicas destes medicamentos (ROGERS, M. J. et al., 2011) (Figura 1).

Fig. 1 - Estrutura química do PI e BF. Em destaque vermelho a diferença do átomo de oxigênio, na fórmula do PI e do átomo de carbono central ligado à cadeia R1 e R2, na fórmula BF.

Fonte: Adaptado de Mahhs et al (2009)

A substituição de diferentes grupos nas posições dos radicais R1 e R2 ligados ao carbono central confere propriedades específicas para cada BF. Enquanto que o grupo R1 afeta a afinidade do composto por cristais ósseos, o grupo R2 é responsável por sua potência e atividade farmacológica (FLEISCH, H., 1989). A presença do grupo (OH) na posição do R1 confere ligação mais forte ao osso, esta característica pode ser encontrada no alendronato, etidronato, ibandronato, pamidronato, risedronato e AZ. Por outro lado, a presença do cloro (Cl) no R1, como no clodronato, leva a uma ligação reduzida ao osso (MAAHS, M. N., VP. AZAMBUJA, AA. CHERUBINI, K, 2009).

Os BF podem ser classificados em não nitrogenados/simples (S-BF) e BF nitrogenados (N-BF) de acordo com a composição da cadeia R2 (BASSETT, C. A. et al., 1969; EBETINO, F. H. et al., 2011; RUSSELL, R. G., 2011). Os N-BF, por apresentar o átomo **N** em sua composição, possuem maior potência na inibição da reabsorção. Porém a estrutura R2 pode apresentar muitas variações entre os N-BF, fazendo com que cada droga possua um mecanismo de ação e potência específicos

(EBETINO, F. H. et al., 2011; RUSSELL, R. G., 2011), sendo que quanto maior a cadeia lateral R2 com o átomo **N**, maior seria a potência das drogas (RUSSELL, R. G., 2006; RUSSELL, R. G. et al., 2007).

A primeira geração dos BF compreende os S-BF que incluem os análogos do ATP: etidronato, clodronato e tiludronato. A segunda e a terceira gerações são representadas pelos N-BF. Alendronato, pamidronato e ibandronato, fazem parte da segunda geração de 10 a 1000 vezes mais potentes que os da primeira geração. A terceira geração é representada pelo risedronato e AZ, que são caracterizados pela cadeia do hidrocarbono cíclico. O AZ, desenvolvido e patenteado pela Novartis em 1986, é 100 a 850 vezes mais potente que o pamidronato e é considerado o BF de maior potência atualmente (MAAHS, M. N., VP. AZAMBUJA, AA. CHERUBINI, K, 2009).

Até 2001, etidronato, clodronato, pamidronato, risedronato, ibandronato e tiludranato eram os BF de primeira escolha (VASIKARAN, S. D., 2001). Em 2002, o AZ tornou-se o BF mais amplamente usado (MAAHS, M. N., VP. AZAMBUJA, AA. CHERUBINI, K, 2009).

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

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

Fonte: Adaptado de Zen (2014)

2.1.1 Farmacocinética

Atualmente, os BF que podem ser administrados por VO são: etidronato, clodronato, alendronato, risedronato, ibandronato; ou IV: clodronato, ibandronato, pamidronato, AZ (CREMERS, S.; PAPAPOULOS, S., 2011). BF administrados oralmente possuem fraca absorção ao corpo humano, com a taxa de absorção de menos de 1% da dose administrada. A absorção é quase completamente impedida por alimentos contendo cálcio ou outros íons bivalentes que fazem o quelamento da droga (LIN, J. H. et al., 1991).

BF IV são rapidamente removidos do plasma, mostrando taxa de excreção renal de 40% nas primeiras 24 horas. Eles não são metabolizados pelo osso e a excreção renal é a única rota de eliminação (KHAN, S. A. et al., 1997). Em humanos, a absorção é baixa, com biodisponibilidade de 0,7% para alendronato (LIN, J. H., 1996).

2.1.2 Mecanismos de ação

Os efeitos fundamentais dos BF são a inibição da reabsorção óssea, e em altas dosagens, podendo causar, até a total calcificação da estrutura (FLEISCH, H., 1998). O seu mecanismo de ação é baseado na sua alta afinidade pelo cálcio do osso e na prevenção da dissolução de cristais ósseos. Após administrado, BF mantém-se em altas concentrações no osso por um período de tempo prolongado (RODAN, G. A.; FLEISCH, H. A., 1996), em forte ligação com os cristais de hidroxiapatita, já que seu metabolismo não ocorre no osso (MAAHS, M. N., VP. AZAMBUJA, AA. CHERUBINI, K, 2009; MAAHS, M. P. et al., 2011). Apesar dos diferentes grupos de BF atuarem por caminhos diferentes, todos resultam na diminuição do desempenho osteoclástico e na indução a apoptose osteoclástica.

BF possuem mecanismos de ação distintos, dependendo se são ou não nitrogenados. N-BF que incluem AZ e alendronato possuem efeito na atividade osteoclástica e em células tumorais (SUZUKI, K. et al., 2006), eles inibem a enzima chave do caminho mevalonato, FPP-synthase. Como resultado, a sinalização intracelular das proteínas é suprimida, levando a uma inativação da GTPase e interferência em alguns caminhos de transmissão de sinais de citocina. Essas mudanças suprimem a reabsorção óssea e causam defeito na motilidade e morfologia dos osteoclastos, assim como sua organização citoesquelética (MAAHS, M. P. et al., 2011).

S-BF são metabolizados em análogos citotóxicos da ATP, que inibem a função mitocondrial dos osteoclastos, causando sua apoptose (ROGERS, M. J. et al., 2000). A ativação das proteases, chamadas de caspases também é importante na indução da apoptose. Caspases 3, 8 e 9 podem ser ativados pelos BF nos osteoclastos, causando hidrólises de diversas proteínas (MAAHS, M. P. et al., 2011).

In vitro, a reabsorção óssea osteoclástica, que é modulada pelo hormônio paratireóide (PTH), calcitrol, prostaglandinas e citocinas, é inibida. Essa inibição da reabsorção leva a baixos níveis do cálcio sérico e consequentemente, níveis elevados de PTH (VASIKARAN, S. D., 2001). Pesquisas com marcadores bioquímicos mostraram que BF inibe a reabsorção e diminui o *turnover* ósseo (MCCLUNG, M. R. et al., 2005). Os efeitos dessas drogas nos osteoclastos ocorrem

nos seguintes estágios: inibição do recrutamento (HUGHES, D. E. et al., 1989; FLEISCH, H., 1993), redução da vida útil (HUGHES, D. E. et al., 1995), inibição da atividade osteoclástica na superfície do osso (MURAKAMI, H. et al., 1995) e na ativação da apoptose (FLEISCH, H., 1993). Os osteoblastos controlam o recrutamento e a atividade dos osteoclastos condições fisiológicas e patológicas (COLLIN, P. et al., 1992). BF induzem os osteoblastos a secretar um inibidor da reabsorção osteoclástica (VITTE, C. et al., 1996), conhecida como osteoprotegerina (OPG) (VIERECK, V. et al., 2002).

O mecanismo de ação dos BF é ainda pobremente entendido, alguns outros relatos defendem o efeito antiangiogênico da droga (KAPITOLA, J. et al., 2000; FOURNIER, P. et al., 2002; WOOD, J. et al., 2002). A angiogênese é uma resposta para o crescimento da massa tecidual ou então para mudanças na tensão de oxigênio, ou ambos. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) se eleva com a hipóxia. Em adultos, fisiologicamente, a angiogênese ocorre unicamente em situações específicas como a consolidação de fratura. Na artrite reumatóide, malignidades e doenças cardíacas, ela assume um padrão patológico. Baixa proliferação e altos níveis de apoptose foram observados em células epiteliais de ratos sob tratamento com BF, sugerindo que BF inibiria a angiogênese (FOURNIER, P. et al., 2002). O efeito antiangiogênico do AZ demonstrado em ratos suporta o seu uso terapêutico em malignidades ósseas e outras doenças ósseas com componente angiogênico (WOOD, J. et al., 2002).

2.1.3 Indicações

BF são indicados para o tratamento de desordens do metabolismo ósseo. Em crianças, sua indicação é restrita para osteoporose local ou geral (osteogênese imperfeita, osteoporose juvenil idiopática, osteoporose secundária ao uso de corticoesteróides, hiper e hipofosfatemia), doenças do metabolismo ósseo (displasia fibro-óssea polioestótica, miosite ossificante), hiperparatireoidismo primário, calcificações do tecido mole e em condições hipercalcêmicas derivadas de malignidades ou por imobilização (MAAHS, M. N., VP. AZAMBUJA, AA. CHERUBINI, K, 2009).

Em adultos, essas drogas são indicadas em distúrbios de cálcio e do metabolismo ósseo e também para doenças associadas com excessiva atividade osteoclástica, como hiperparatireoidismo primário e secundário e osteoporose (FLEISCH, H., 1998). BF, juntamente com os quimioterápicos, têm sido indicados para tratar a hipercalcemia moderada e acentuada decorrentes de malignidades e lesões osteolíticas metastáticas em câncer de mama e mieloma múltiplo (HILLNER, B. E. et al., 2000; BERENSON, J. R. et al., 2002). Eles também são utilizados para o tratamento da doença de Paget e metástase de pulmão e próstata. BF VO são geralmente prescritos para o tratamento de osteoporose, enquanto que para as lesões osteolíticas associadas com malignidades, os BF IV são os mais indicados (RUGGIERO, S. L. et al., 2004).

Na odontologia, estudos reportam o poder dos BF de estimular a formação óssea em enxertos ósseos autógenos (ALTUNDAL, H.; GURSOY, B., 2005), de reduzir a reabsorção dental e a perda do osso alveolar (SCHENK, R. et al., 1986; LEVIN, L. et al., 2001) e de reforçar a ancoragem dentária, minimizando recorrências ortodônticas (IGARASHI, K. et al., 1994).

Há ainda, alguns estudos que defendem que o AZ pode ter um efeito antitumoral direto nas linhagens de células hematopoiéticas. A droga pode induzir a apoptose de linfócitos-B malignas, se os pacientes receberam quimioterapia ou mostram fenótipo resistente (MAAHS, M. N., VP. AZAMBUJA, AA. CHERUBINI, K, 2009).

2.1.4 Efeitos Adversos

BF é bem tolerado, tanto na administração VO quanto na IV, entretanto, os BF possuem alguns efeitos adversos. Quando administrados VO, os efeitos colaterais mais comuns são dor de cabeça, dispepsia, diarreia e constipação. A esofagite corrosiva pode ocorrer em casos menos frequentes, contra indicando o uso de BF. Quando administrados IV, os efeitos adversos mais comuns são o aumento da temperatura corporal e sintomas semelhantes à gripe, ambos podem ser controlados com analgésicos e antipiréticos. Hipocalcemia e hipofosfatemia transitória também podem ocorrer, geralmente sem repercussão clínica (MAAHS, M. N., VP. AZAMBUJA, AA. CHERUBINI, K, 2009). Úlceras gástricas e estenose esofágica

também foram reportadas (MAAHS, M. N., VP. AZAMBUJA, AA. CHERUBINI, K, 2009). Inibição da mineralização óssea pode ocorrer, levando a aspectos clínicos e histológicos de osteomalacia (ADAMSON, B. B. et al., 1993). Entre os efeitos adversos bucais, ulceração do assoalho de boca e a osteonecrose dos maxilares (RUGGIERO, S. L. et al., 2004; CARTER, G. et al., 2005), têm sido reportadas. Devido ao aumento da incidência de lesões malignas e ao aumento do uso de BF, os seus efeitos adversos devem ser ainda mais investigados.

2.2 Osteonecrose dos maxilares induzida pelo uso de bisfosfonatos Incidência

2.2.1 Definição

Osteonecrose (ON) é definida como uma necrose avascular do osso (ASTRAND, J.; ASPENBERG, P., 2002), que geralmente ocorre em pacientes com radio ou quimioterapia prévios ou em terapia de outras drogas como corticosteroides (MIRZAI, R. et al., 1999). Ela resulta de uma perda permanente ou transitória de suprimento sanguíneo, que leva à necrose e colapso ósseo (NASE, J. B.; SUZUKI, J. B., 2006). Pacientes sob terapia de BF também podem desenvolver necrose óssea alveolar. A Osteonecrose dos Maxilares induzida pelo uso de BF (OMAB) foi primeiramente descrita por Marx em 2003 (MARX, R. E., 2003). Ela é descrita como uma exposição óssea que persiste por mais de 8 semanas na cavidade oral em pacientes sob tratamento com BF e que não foram submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço (MARX, R. E., 2003).

Clinicamente, apresenta-se como um osso infectado e necrótico, exposto na cavidade bucal com edema e eritema dos tecidos moles (BERTE, R. et al., 2006). Ulceração da mucosa é frequente e o osso exposto possui uma coloração branca amarelada, o tecido mole adjacente apresenta-se geralmente edemaciado devido infecção secundária. Nos estágios iniciais, o osso exposto é discreto, mas com o passar do tempo, torna-se evidente e susceptível a fraturas secundárias. O tecido ósseo necrótico é geralmente assintomático e sem sangramento à sondagem, a dor resulta da infecção secundária dos tecidos moles ou então do trauma das bordas irregulares do osso necrótico. OMAB é progressiva e pode levar a extensivas áreas

de osso exposto e deiscências (MAAHS, M. N., VP. AZAMBUJA, AA. CHERUBINI, K, 2009).

OMAB é um efeito adverso debilitante e doloroso que causa dificuldades para a alimentação, fala e higienização dos pacientes. Ela ainda pode predispor a infecções locais, levando a uma mobilidade e consequente perda dentária. Comunicações buco-sinusais, fístulas cutâneas (MORTENSEN, M. et al., 2007), inflamação crônica e halitose também podem estar presentes. Infelizmente, é muito difícil de ser diagnosticada em seus estágios iniciais (RUGGIERO, S. L. et al., 2006; BEDOGNI, A. et al., 2008) e não responde satisfatoriamente aos tratamentos convencionais, como debridamento cirúrgico, oxigenação hiperbárica e antibioticoterapia, ocorrendo até, em muitos casos, um aumento da região acometida frente à intervenção cirúrgica, afetando demasiadamente a qualidade de vida dos indivíduos (RUGGIERO, S. L. et al., 2006). Atualmente, não há tratamento clínico nem métodos de diagnóstico concretamente instaurado e altamente efetivo para a OMAB, sendo a terapia paliativa conservativa com analgesia e controle da progressão da doença o tratamento recomendado (BODY, J. J., 1997).

2.2.2 Classificação

Há grande variação de sinais e sintomas associados com a OMAB, devido à dosagem e regime de BF e duração do tratamento (RUGGIERO, S. L. et al., 2006). Diferentes autores a classificam de forma discretamente diferente (tabela 2, 3 e 4).

Tabela 2 - Classificação da OMAB pela AAOMS:

Estágio	Sinais clínicos e radiográficos
0	Não apresenta sinais clínicos de OMAB, porém apresenta sintomas relacionados
1	Área de exposição óssea, mas sem sintomatologia e/ou sinais de infecção
2	Área de exposição óssea com infecção apresentando dor com ou sem drenagem de secreção purulenta
3	Área de exposição óssea com dor, infecção e um dos seguintes achados: fraturas patológicas, comunicação buco-sinusal ou osteomielite estendendo para a base da mandíbula ou soalho do seio maxilar

Tabela 3 - Estágios clínicos da OMAB de acordo com Ruggiero et al. (2006)

Estágio	Sinais clínicos e radiográficos
1	Osso exposto, necrótico, assintomático
2	Osso exposto, necrótico, associado com dor e infecção
3	Osso exposto, necrótico com dor, infecção, fratura patológica, fístula extra ral ou osteólise estendendo-se até a base da mandíbula

Tabela 4 - Estágios clínicos da OMAB de acordo com Wilde et al (2012)

Estágio	Sinais clínicos e radiográficos
0	Osso necrótico não exposto
1	Osso necrótico exposto assintomático ou fístula intraoral única
2	Osso necrótico exposto associado com dor e infecção
3	Osso necrótico exposto associado com dor; infecção com edema e abscesso; fístulas intraorais múltiplas e achados radiológicos de extensa osteólise
4	Osso necrótico exposto associado com dor, infecção com edema e abscessos; fraturas patológicas, fístula naso-oral, fístula extraoral, osteólise estendendo até a base inferior

2.2.3 Incidência

A incidência de OMAB, baseada em informações do fabricante do alendronato, é de 1 em 143.000 pessoas/ano submetidas a tratamento odontológico (MIGLIORATI, C. A. et al., 2005a). A incidência entre o grupo de pacientes com administração IV para o controle de neoplasias malignas varia entre 0,8% a 12% (RUGGIERO, S. L. et al., 2009). Para o grupo de administração V.O. de BF, esses índices caem drasticamente para valores que variam de 0,00038% a 0,06 (MAVROKOKKI, T. et al., 2007).

A incidência da OMAB em pacientes com mieloma múltiplo medicados com zalendronato foi analisada e mostrou-se próximo a 5% em estudo retrospectivo (WALTER, C. et al., 2010). Em estudo retrospectivo em pacientes com câncer de mama, a incidência da OMAB foi de 5,4% entre 75 pacientes (WALTER, C. et al., 2009).

A incidência pode ser modulada pela natureza da droga, fatores locais e sistêmicos. A potência do BF a duração do tratamento são diretamente proporcionais ao aparecimento da OMAB. A realização de exodontias ou cirurgias dentoalveolares, previamente ao desenvolvimento da ON, em pacientes sob terapia com BF foi relatada em 86% (RUGGIERO, S. L. et al., 2004).

Há alguns fatores de risco para o aparecimento da OMAB, são elas as cirurgias dentoalveolares como extrações, colocação de implantes, cirurgias periapicais e periodontais. Pacientes sob terapia de BF IV e cirurgias dentoalveolares possuem no mínimo 7x mais possibilidade de desenvolver OMAB do que os pacientes que não possuem a cirurgia concomitante (RUGGIERO, S. L. et al., 2009). A realização de exodontias ou cirurgias dentoalveolares, previamente ao desenvolvimento da osteonecrose, em pacientes sob terapia com BF foi relatada em 86% (RUGGIERO, S. L. et al., 2004).

Em Ruggiero *et al.* 2004, somente 14% dos pacientes não tinham histórias de qualquer procedimento dento-alveolar recente (RUGGIERO, S. L. et al., 2004). Em Walter *et al.* 2007, todos os 161 pacientes com exceção de um, mostraram um fator desencadeante adicional como extração dentária (n=14), procedimento cirúrgico

dentário (n=2) ou crista milohióide acentuada (n=3) (WALTER, C. et al., 2007). Tratamento ortodôntico também pode elevar o risco da OMAB, a diminuição da atividade osteoclástica faz com que o tratamento ortodôntico seja mais longo (IGARASHI, K. et al., 1994). Terapias invasivas com laser, ancoragem com mini-implantes e extração dentária devem ser evitadas (GRAHAM, J. W., 2006). Em um estudo de 119 relatos de casos e correlação com os gatilhos, em 37% o gatilho foi a extração dentária; 28,6%, a doença periodontal; 11,2%, cirurgia periodontal regressa; 3,4%, implantes dentários, 0,8% apicetomia; e em 25,2%, o aparecimento da OMAB foi aparentemente espontânea (WILKINSON, G. S. et al., 2007).

Outros fatores locais significantes incluem doença periodontais, úlceras por trauma protético (WALTER, C. et al., 2010) e também referentes aos hábitos do paciente como fumo, álcool e higiene oral deficiente (RUGGIERO, S. L. et al., 2009). Portanto, recomendamos que antes do tratamento com BF, o paciente deve passar por um completo exame bucal; qualquer dente comprometido deve ser removido, todos os procedimentos bucais devem ser concluídos e uma saúde periodontal excelente deve ser atingida a fim de evitar procedimentos odontológicos após o início da terapia.

Fatores sistêmicos como diabetes melito, imunossupressão, uso de outras medicações concomitantes, como agentes quimioterápicos e corticosteroides também parecem ter relação com a manifestação da OMAB (ALLEN, M. R.; BURR, D. B., 2009). Anemia, distúrbios hemorrágicos, infecção, doenças bucais pré-existent, histórico familiar, uso de álcool e tabaco também são fatores predisponentes (MIGLIORATI, C. A., 2003; PURCELL, P. M.; BOYD, I. W., 2005). Há também uma hipótese genética que defende que, características genéticas estão associadas à susceptibilidade ao BF (MIGLIORATI, C. A. et al., 2005b).

OMAB, como descrito em seu nome é restrita aos maxilares, essa especificidade provavelmente deve-se ao fato de que os maxilares são expostos ao ambiente via sulco gengival (MAAHS, M. N., VP. AZAMBUJA, AA. CHERUBINI, K, 2009) e de que os maxilares podem ser afetados por doenças periodontais, abscessos e lesões periapicais (MARX, R. E. et al., 2005). Portanto, após o uso de BF, o *turnover* ósseo, é incapaz de responder adequadamente às necessidades metabólicas e assim, a OMAB surge (RUGGIERO, S. L. et al., 2004). Os maxilares

estão sempre sujeitos a estímulos de pressão, demandando um alto índice de remodelação óssea, quando o BF inibe o processo de remodelação sob condições de altas demandas metabólicas, ele também torna o osso mais susceptível para a ON (MCMAHON, R. E. et al., 2004).

A mandíbula costuma ser mais afetada do que a maxila, ela envolve aproximadamente 63% dos pacientes (RUGGIERO, S. L. et al., 2004). A região posterior da mandíbula é a área mais afetada, seguido pela região posterior da maxila (MARX, R. E. et al., 2005), especialmente nos casos de extração dentária (MAAHS, M. N., VP. AZAMBUJA, AA. CHERUBINI, K, 2009). Sinais de osteólise (RUGGIERO, S. L. et al., 2004), assim como necrose avascular com exposição óssea espontânea (MARX, R. E., 2003; MIGLIORATI, C. A., 2003) sem história de procedimentos dento-alveolares podem ocorrer (MAAHS, M. N., VP. AZAMBUJA, AA. CHERUBINI, K, 2009). Casos espontâneos podem ser relacionados à características anatômicas e fisiológicas da área afetada, como a pequena espessura da mucosa na região posterior da mandíbula (MARX, R. E., 1983), ou então devido a traumas de próteses removíveis (BROOKS, J. K. et al., 2007). Casos espontâneos na mandíbula também podem estar associados com particularidades do suprimento sanguíneo terminal dessa região (BAGAN, J. V. et al., 2005).

2.2.4 Etiopatogenia

Muitas teorias a respeito da etiologia e patogênese da OMAB têm sido atualmente discutidas, porém, ainda não completamente elucidadas. A OMAB parece advir de uma complexa interação entre o metabolismo ósseo, trauma local, infecção e hipovascularização associadas ao uso de BF (ALLEN, M. R.;BURR, D. B., 2009). As principais teorias sobre a sua etiopatogênese incluem a teoria da supressão do *turnover* ósseo (MARX, R. E. et al., 2005; ALLEN, M. R.;BURR, D. B., 2009), efeito antiangiogênico (FOURNIER, P. et al., 2002) e a toxicidade do tecido mole (REID, I. R. et al., 2007; ALLEN, M. R.;BURR, D. B., 2009), teorias estas que serão abordadas a seguir.

2.2.4.1 Supressão do turnover ósseo

Os BF atuam no sistema de remodelação óssea na inibição dos osteoclastos, suprimindo o processo de reabsorção óssea (ALLEN, M. R.;BURR, D. B., 2009). Quando administrados, BF acumulam-se em locais de mineralização óssea, permanecendo nestes sítios por meses ou anos, até ocorrer a reabsorção. Até que isso ocorra eles atuam sobre a reabsorção óssea principalmente ao inibirem o recrutamento e promoverem a apoptose dos osteoclastos, além de estimularem a atividade osteoblástica (ALLEN, M. R.;BURR, D. B., 2009).

Essa situação é de particular relevância na cavidade oral, pois os maxilares possuem uma maior vascularização e maior atividade celular que outros ossos, devido a sua atividade diária e presença de dentes, necessitando de remodelações constantes ao redor do ligamento periodontal. Essa demanda funcional aumentada dos maxilares supera a capacidade de reparo, levando a um acúmulo progressivo de tecido ósseo desvitalizado, originando as lesões de necrose óssea (MARX, R. E. et al., 2005).

2.2.4.2 Efeito Antiangiogênico

De acordo com essa teoria, a proliferação de células endoteliais seria inibida nos maxilares devido à administração de BF e resultaria em uma diminuição da rede vascular dos vasos com consequente necrose avascular do tecido ósseo (FOURNIER, P. et al., 2002).

2.2.4.3 Toxicidade à mucosa de recobrimento

A concentração de BF no tecido ósseo dos maxilares pode possuir toxicidade direta ao epitélio bucal inibindo o processo de reparo tecidual da mucosa por meio de uma interferência na sinalização molecular de fibroblastos e queratinócitos. Dessa forma, as multiplicação e migração dessas células são inibidas e áreas de tecido ósseo permaneceriam expostas por tempo prolongado na cavidade bucal podendo causar áreas de necrose óssea (REID, I. R. et al., 2007; ALLEN, M. R.;BURR, D. B., 2009).

2.2.5 Diagnóstico e tratamento

Atualmente, o diagnóstico da OMAB é baseado na história médica do paciente e avaliação clínica (dor, exposição óssea, secreção purulenta, edema). A aparência inicial é variável, portanto, geralmente a ciência da lesão se dá em estágios avançados, quando há sintomatologia dolorosa (OLUTAYO, J. et al., 2010). O principal sintoma, geralmente é a dor (81,7% dos pacientes), entretanto em 2% dos casos ela pode ser assintomática. O diagnóstico precoce das lesões é essencial para prevenir e controlar a morbidade associada com lesões avançadas (RUGGIERO, S. L. et al., 2004).

A interrupção dos BF previamente à extração dentária não garante a prevenção da OMAB, pois a droga permanece no tecido ósseo por anos (MARX, R. E. et al., 2005; PURCELL, P. M.;BOYD, I. W., 2005). Apesar da tentativa de tratamentos cirúrgicos conservativos, OMAB residual persiste em aproximadamente, 72,5% dos casos (VAN DEN WYNGAERT, T. et al., 2006). Em muitos casos, o tratamento cirúrgico pode até exacerbar as lesões. A remoção do tecido adjacente é contra indicado porque pode causar aumento da área exposta. Extrações dentárias tendem a aliviar a dor momentaneamente, mas elas podem também levar a uma maior exposição óssea e dor. Retalhos cirúrgicos também não são recomendados pois podem fistulizar e também aumentar a exposição óssea (MARX, R. E., 2003). Há outras propostas de tratamento, como enxaguatórios bucais, antibióticos sistêmicos, terapia com câmara hiperbárica, mas todos têm se mostrado ineficazes (MIGLIORATI, C. A. et al., 2005a; PURCELL, P. M.;BOYD, I. W., 2005). Apesar da estabilização do câncer, pacientes com OMAB possuem qualidade de vida muito baixa (MIGLIORATI, C. A., 2003).

A prevenção das lesões requer avaliação minuciosa e adequação do meio bucal (PURCELL, P. M.;BOYD, I. W., 2005). Exames clínicos e radiográficos e/ou qualquer outro procedimento invasivo necessário devem ser realizados previamente a terapia dos BF. Se o paciente se submete a um procedimento oral invasivo, é recomendado que os BF sejam adiados por um mês até que se complete a cicatrização. Se a terapia está em andamento, exames clínicos da cavidade oral devem ser realizadas a cada 4 meses, com orientação sobre a presença de placa bacteriana e instruções sobre higienização bucal. A cada exame, o dentista deve

examinar a boca cuidadosamente para detectar outras áreas de osso exposto. Em casos de necessidade de reabilitação, é recomendável que esta seja feita com prótese fixa, bem adaptada, evitando dessa forma, úlceras traumáticas (MAAHS, M. N., VP. AZAMBUJA, AA. CHERUBINI, K, 2009). O aumento do número de OMAB e a resposta debilitada às terapias exigem cuidado profilático em paciente de alto risco, a prevenção ainda é a melhor abordagem (WALTER, C. et al., 2007).

2.2.5.1 Histopatológico

ON e OMAB são muito semelhantes clinicamente, entretanto, estudos afirmam que elas podem ser diferenciadas no exame histológico. Na ON há áreas homogêneas extensas de osso completamente necrótico, enquanto que na OMAB, consiste em áreas múltiplas de osso necrótico e parcialmente confluentes com osso vital. Colônias de *Actinomyces sp.* e inflamatório infiltrado podem ser encontrado em ambos (HANSEN, T. et al., 2006). Em cultura de células, verificou-se que pacientes com OMAB possuem microbiota normal (MORTENSEN, M. et al., 2007). Histologicamente, a inflamação é similar a osteomielite e áreas de osso necrótico acelular. Exames microbiológicos mostraram a presença de *Actinomyces* em vinte pacientes, nos outros nove pacientes outras espécies incluindo *Peptostreptococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Eikenella sp.*, *Prevotella sp.*, *Porphyromonas sp.* e *Fusobacterium sp* (BADROS, A. et al., 2006).

Apesar de estudos afirmarem que é possível diferenciar a OMAB de outras lesões com sinais e sintomas semelhantes através da análise histopatológica (HANSEN, T. et al., 2006), a biópsia requer acesso cirúrgico, que especificamente nos casos desses pacientes que possuem deficiência na cicatrização pós-cirúrgica, podendo agravar ainda mais o quadro, definindo a grande importância do exame radiográfico (PHAL, P. M. et al., 2007).

2.2.5.2 Exames de Imagem

OMAB é primariamente diagnosticada clinicamente, entretanto, os exames de imagem são essenciais. Com eles, podemos determinar a extensão da lesão, fazer o diagnóstico em estágios iniciais e identificar doenças metastáticas e fraturas

(KRISHNAN, A. et al., 2009; MORAG, Y. et al., 2009). Diferentes exames radiológicos têm sido aplicados nos casos de OMAB, como a radiografia panorâmica, radiografias periapicais, tomografia computadorizada, ressonância magnética e cintilografia (ARCE, K. et al., 2009), mas nenhum padrão ouro ainda foi estabelecido (MORAG, Y. et al., 2009). Essas ferramentas do diagnóstico também são importantes para o planejamento terapêutico, para o acompanhamento da progressão da doença e também para o diagnóstico diferencial com outras patologias (ARCE, K. et al., 2009).

Os achados radiológicos não são específicos e podem ser encontrados em outras condições como na osteomielite, na osteoradionecrose, nas metástases ósseas e na doença de Paget (ARCE, K. et al., 2009). O diagnóstico da OMAB radiograficamente é geralmente baseado em parâmetros subjetivos como a detecção do espessamento do periósteo, esclerose crônica, aumento da radiopacidade óssea (WILDE, F. et al., 2012) neoformação óssea, formação de sequestros ósseos e expansão óssea (ARCE, K. et al., 2009).

Os diagnósticos diferenciais para a OMAB são: osteoradionecrose, osteomielite esclerótica crônica, carcinoma metastático e doença de Paget. Na osteoradionecrose, o paciente possui histórico de radioterapia prévia e radiograficamente, apresenta bordas das lesões má definidas. Na osteomielite esclerótica crônica, radiograficamente apresenta sequestro, reação periostal, esclerose e expansão óssea. Carcinoma metastático geralmente ocorre na região posterior da mandíbula apresentando-se como lesões líticas múltiplas, com exceção das lesões metastáticas de câncer de próstata e de mama, que podem apresentar-se escleróticas. Na Doença de Paget, há expansão óssea e espessamento das trabéculas (MOEINI, M. et al., 2013).

O achado radiográfico mais comum é a osteoclerose (esclerose da margem alveolar e espessamento da lâmina dura). Pacientes com esclerose mais exacerbada, apresentam quadro semelhante ao de osteopetrose. Estreitamento do canal alveolar pode ser encontrado em lesões maiores. Outros achados clínicos com menor incidência são: osteólise, reação periostal, fistula oroantral, sequestros ósseos, radiolucidez periapical e tumefação dos tecidos moles (MOEINI, M. et al., 2013).

Ainda não há diretrizes definidas para o diagnóstico clínico-radiográfico da OMAB. Na maioria dos casos, a área de ulceração visível clinicamente é bem menor que a área de osso necrótico subjacente (BEDOGNI, A. et al., 2007; OLUTAYO, J. et al., 2010), tornando a avaliação por imagem mandatória para acessar a real extensão da lesão.

2.2.5.2.1 Radiografias bidimensionais

Os exames radiográficos bidimensionais incluem principalmente as radiografias periapicais e a radiografia panorâmica, que permitem rápida visualização das áreas de estudo. As panorâmicas são geralmente utilizadas como exame inicial para a avaliação da OMAB (RUGGIERO, S. L. et al., 2004; CHIANDUSSI, S. et al., 2006). Nessas radiografias, os achados mais importantes incluem aumento da espessura da lâmina dura, osteólise, esclerose difusa e cicatrização pobre ou inexistente em sítios cirúrgicos (CHIANDUSSI, S. et al., 2006; PHAL, P. M. et al., 2007; BEDOGNI, A. et al., 2008). Parece haver uma correlação entre o grau de esclerose e a gravidade clínica da progressão da doença. Em casos avançados, há sinais radiográficos do estreitamento do canal mandibular, correspondendo clinicamente com a parestesia que esses pacientes podem experimentar (Figuras 2 e 3).

Fig. 2 - Aspectos radiográficos na OMAB progressivamente. A: normal; B: esclerose envolvendo a margem alveolar acompanhada pelo espessamento da lâmina dura; C: esclerose difusa podendo ocasionar a invasão e diminuição do diâmetro do canal mandibular.

Fonte: modificado de Phal (2007)

Fig. 3 - A: seleção de radiografia panorâmica magnificado mostrando periodonto normal, flechas enfatizando a integridade da lâmina dura, espaço periodontal e crista alveolar. B: recorte de radiografia panorâmica magnificado de paciente sob uso de BF há 5 anos. Flecha branca evidenciando a osteoesclerose da margem alveolar e flecha preta evidenciando o espessamento do ligamento periodontal. C: recorte de radiografia panorâmica magnificado de paciente sob 6 anos de uso de BF, observa-se progressão de lesão mista na região do alvéolo de extração (flecha fina) e esclerose progressiva do ligamento periodontal (flecha grossa)

Fonte: modificado de Arce (2009)

Estágios iniciais da OMAB são difíceis de serem diagnosticados por radiografias convencionais. Ademais, nas radiografias convencionais, as alterações só são detectadas quando há 30-50% de desmineralização óssea. Radiografias panorâmicas possuem resolução limitada devido à sua natureza bidimensional com sobreposição de estruturas e podem não proporcionar a visualização da verdadeira extensão dos defeitos ósseos (OLUTAYO, J. et al., 2010). A radiografia panorâmica tende a subestimar a verdadeira extensão da lesão e também tendem a não identificar pequenos sequestros (HIRSHBERG, A. et al., 1994; SPRECHER, S. et al., 2002). O conjunto da investigação clínica, história médica e exames de imagem trabalham juntos para o fechamento do diagnóstico de OMAB.

2.2.5.2.2 Tomografia computadorizada de feixe cônico

A tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) é um método de diagnóstico por imagem indicada especialmente para o complexo dentomaxilofacial amplamente utilizado na Odontologia. Ela possibilita a reformatação da imagem em três dimensões dos tecidos mineralizados com mínima distorção e dose de radiação e custo reduzidos comparados à TC helicoidal. (TSIKLAKIS, K. et al., 2005; LUDLOW, J. B. et al., 2006; LUDLOW, J. B., 2008; LUDLOW, J. B.; IVANOVIC, M., 2008). Esse exame permite ao cirurgião-dentista acesso a imagens e estruturas que

até então não eram possíveis com o uso das radiografias convencionais (SCARFE, W. C. et al., 2006; LOUBELE, M. et al., 2008).

A imagem é formada com um feixe de raios X cônico divergente que passa pela região de interesse e atinge o detector que está em movimento rotatório sincronizado em direção oposta. Durante a rotação centenas de imagens planares sequenciais da região de interesse denominada FOV (*Field of view*), são obtidas num arco completo ou parcial e unidas para formar a imagem tridimensional (SCARFE, W. C.; FARMAN, A. G., 2008; CAVALCANTI, M., 2010). O computador processa tais imagens, gerando dados volumétricos tridimensionais que podem ser posteriormente reconstruídos em diferentes planos (axial, sagital e coronal) e reformatações panorâmicas e parassagittais podem ser geradas a partir da marcação de pontos demarcados no arco dentário das reformatações axiais (SCARFE, W. C. et al., 2006).

A TCFC mostrou-se apropriada para o complexo craniofacial, pois produz imagens de estruturas com alto contraste e pode ser aplicada na avaliação de estruturas mineralizadas, além da acurácia e confiabilidade das medidas lineares (LASCALA, C. A. et al., 2004). Este recurso tecnológico tem se tornado cada vez mais disponível na prática odontológica e suas vantagens são inúmeras, mas o valor-diagnóstico deve ser sempre levado em conta na requisição desses exames (IMADA, T. S. N., 2011).

Essa tecnologia pode ser utilizada para análises anatômicas diversas, melhorando o diagnóstico de mudanças na densidade óssea, o planejamento de implantes e o monitoramento ósseo com exposição aos raios x reduzidos, com aproximadamente até menos de um terço da radiação de um levantamento periapical, dependendo do protocolo utilizado (LUDLOW, J. B. et al., 2003). Os recentes avanços das técnicas da TCFC e das ferramentas de seus *softwares* possibilitaram o seu uso, principalmente no planejamento cirúrgico, especialmente para procedimentos de cabeça e pescoço e para a detecção e quantificação da OMAB (MIRACLE, A. C.; MUKHERJI, S. K., 2009). O diagnóstico dos pacientes com OMAB deveria incluir a tomografia computadorizada, pois ela auxilia na identificação de achados difíceis de serem diagnosticados em exames bidimensionais e ainda dispõem informações tridimensionais e melhor delineamento da extensão da lesão

(ARCE, K. et al., 2009). Os estudos revelam que a tomografia computadorizada e/ou a ressonância magnética (MRI) são os métodos de imagem mais úteis para as regiões afetadas pelo OMAB (BIANCHI, S. D. et al., 2007; BISDAS, S. et al., 2008).

Olutayo *et al.* 2010, sugerem que há um padrão na progressão da OMAB. Seus estudos mostram que as mudanças iniciam-se na lamina dura e na cortical óssea. Depois, progride para o osso trabecular e finalmente, envolve o osso completamente (OLUTAYO, J. et al., 2010).

Diferente das pesquisas que fizeram a análise subjetiva, Guggenberger 2014 avaliaram quantitativamente através das análises de exames da TCFC, a condição óssea de pacientes com OMAB e compararam a confiabilidade do exame qualitativo. Eles concluíram que os parâmetros quantitativos apresentaram uma melhor performance diagnóstica do que os parâmetros qualitativos (GUGGENBERGER, R. et al., 2014).

A esclerose focal encontra-se presente desde os estágios iniciais da doença com a presença de um padrão trabecular desorganizado e com pobre diferenciação córtico-medular. A região afetada demonstra o envolvimento ósseo inteiramente. Linfadenopatia cervical, pela presença da infecção no osso exposto; espessamento dos músculos da mastigação; espessamento mucoperiostal, formação de fístula e até neoformação óssea nos seios maxilares são outros sinais encontrados na TCFC de pacientes com OMAB (ARCE, K. et al., 2009) (Figuras 4, 5, 6).

Fig. 4 - Reformatação da TCFC axial (A) e reformatação panorâmica obtidas com o Scanora 3D® demonstrando espessamento da cortical óssea e aumento da densidade medular focal na região de mandíbula esquerda.

Fonte: Olutayo (2010)

Fig. 5 - Reformatação da TCFC coronal (A), sagital (B), axial (C) e reconstrução tridimensional (D) obtidas com o Scanora 3D® demonstrando extensa região de necrose óssea. Centralmente, sequestro ósseo bem delimitado evidente, envolvendo o teto do canal mandibular.

Fonte: Olutayo (2010)

Fig. 6 - Reformatação da TCFC coronal (A), sagital (B), axial (C) e reconstrução tridimensional (D) obtidas com o Scanora 3D® demonstrando extensa área necrótica acompanhado de fratura mandibular.

Fonte: Olutayo (2010)

Bedogni 2012 *et al.* Sugeriram que o critério de avaliação por TCFC seja incluído à classificação da OMAB pela AAOMS. A classificação proposta encontra-se na tabela 5.

Tabela 5 - Estágios clínicos e tomográficos da OMAB de acordo com Bedogni et al (2012) (BEDOGNI, A. et al., 2012)

Estágio	Sinais clínicos e radiográficos
1 – OMAB focal	<p><u>Sinais clínicos e sintomas:</u> exposição óssea, mobilidade dental, alvéolo sem reparo após extração, fístula, edema, abscesso, trismo, deformidades mandibulares e/ou parestesia dos lábios</p> <p><u>Achados tomográficos:</u> aumento da densidade óssea limitada a região de osso alveolar (espessamento das trabéculas e/ou osteoesclerose focal), com ou sem os seguintes sinais: lâmina dura marcadamente espessa, alvéolo persistente e/ou interrupção cortical.</p> <p>1a. Assintomático</p> <p>1b. Sintomático (dor e pus)</p>
2 - OMAB difusa	<p><u>Sinais clínicos e sintomas:</u> mesmos do que os do estágio 1</p> <p><u>Achados tomográficos:</u> aumento da densidade óssea estendendo-se para o osso basilar (osteoesclerose difusa), com ou sem os seguintes sinais: proeminência do canal do nervo alveolar inferior, reação periostal, sinusite, formação de sequestros ósseos e/ou fistula oro-antral</p> <p>2a. Assintomático</p> <p>2b. Sintomático (dor e pus)</p>
3 – OMAB complexa	<p><u>Sinais clínicos e sintomas:</u> Mesmos do que os do estágio 2 com um ou mais desses sinais e sintomas: fistula extra oral, tocos mandibulares deslocados, vazamentos nasais de fluidos</p> <p><u>Achados tomográficos:</u> osteoesclerose de ossos adjacentes (zigoma, palato duro), fraturas mandibulares patológicas, e/ou osteólise estendendo-se ao assoalho do seio maxilar</p>

2.2.6.1 Micro-CT

Desde a invenção dos Raios X por Roentgen em 1895, a tecnologia tem levado a uma verdadeira revolução no diagnóstico médico. Atualmente é possível a visualização do funcionamento interno do corpo de forma não invasiva (DUNN, P. M., 2001). A tomografia computadorizada foi desenvolvida no início de 1970, desde então, tecnologias avançadas no diagnóstico por imagem tem revolucionado a prática da medicina e a partir de então foi possível a avaliação tridimensional das estruturas (HOUNSFIELD, G. N., 1973). Uma tecnologia capaz de eliminar a sobreposição de imagens, com valores reais de medidas lineares e angulares, sem distorção e capaz de reconstruir a imagem em diversos planos tridimensionalmente se fundou uma ferramenta de grande valor para o diagnóstico e elaboração do plano de tratamento cirúrgico (WHAITES, E., 2003). No final dos anos 80, Feldkamp e colaboradores, introduziram a tecnologia da Micro-CT (μ CT) (FELDKAMP, L. A. et al., 1989).

A μ CT usa dados de atenuação do raio X adquiridos em vários ângulos para reconstruir uma representação tridimensional do espécime que caracteriza a distribuição espacial da densidade do material. Os escâneres de μ CT disponíveis possuem tamanho de voxel isotrópico tão pequeno quanto poucos micrometros, que é suficiente para investigar estruturas como a trabécula de ratos que possuem tamanho de aproximadamente 30 a 50 micrometros (BOUXSEIN, M. L. et al., 2010). Os *scanners* tomográficos clínicos geralmente produzem imagens compostas por 1 mm³ de voxel (*volume elements*), enquanto que a Tomografia microcomputadorizada de raios X conhecida como μ CT, tem resolução espacial muito melhor, podendo produzir voxels variando de 5-50 μ m que é aproximadamente 1.000.000 vezes menor que o volume da CT clínica (FELDKAMP, L. A. et al., 1989; KUHN, J. L. et al., 1990).

Os primeiros *scanners* da μ CT eram personalizados e limitadamente disponíveis. Atualmente, sistemas comerciais compactos estão disponíveis e vêm rapidamente se tornando essenciais em pesquisas acadêmicas e industriais (SWAIN, M. V.; XUE, J., 2009). Essa nova tecnologia tem sido utilizada principalmente para avaliação de tecidos mineralizados como osso, dente e materiais (cerâmicas, polímeros, biomateriais) e para tecidos moles como pulmão (com injeção de contraste radiográfico). Com a evolução dos sistemas da μ CT, hoje

é possível até realizar estudos *in vivo* de alta resolução em animais de pequeno porte (GULDBERG, R. E. et al., 2003). Por outro lado, como resultado da grande variedade de sistemas, há vários tipos de abordagem na aquisição da imagem, na avaliação da imagem e nos relatórios dos resultados, gerando uma falta de consistência para interpretar os resultados e para comparar os achados nos diferentes estudos, demonstrando a necessidade de uma diretriz para a padronização (BOUXSEIN, M. L. et al., 2010).

O sistema μ CT utiliza a tecnologia de Raios X com emissores microfocais e detectores de alta resolução, que permitem projeções rotacionais através de múltiplas direções, produzindo imagens tridimensionais reconstruídas que caracterizam a distribuição espacial da densidade do material. As imagens representam mapas das distribuições espaciais dos coeficientes de atenuação linear, determinada pela energia da fonte de raios x e a composição atômica do material estudado (SWAIN, M. V.;XUE, J., 2009) (Figura 7).

Fig. 7 - Princípio da tecnologia μ CT. O tubo microfocal emite raios x que são colimados e filtrados, 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. Desse modo, é realizada uma varredura completa que envolve um conjunto de projeções sob diferentes rotações do objeto.

Fonte: Modificado de Stauber e Muller 2008

Uso da Micro-CT

A μ CT tem sido usada para diferentes pesquisas na área médica (Bouxsein et al 2010 garcia): estudo de crescimento e desenvolvimento, estudo de fenótipo esquelético em modelo murino, estudo genético em ratos alterados, estudo de osteoporose ou distrofia renal pós menopausa em modelo animal, estudo de interações farmacológicas, estudo mecânico de cargas e forças de estresse, estudos de cicatrização de fraturas, estudo sobre a morfologia articular, entre outros (GONZALEZ-GARCIA, R.;MONJE, F., 2013). Em relação à análise óssea, diversos estudos comparam os resultados obtidos entre a histomorfometria e μ CT, entretanto, a maioria deles focam na crista ilíaca, vértebra e fêmur em modelos animais ou cadáveres humanos (ENGELKE 1993, MUULER 1996, UHIYAMA 1997). González-García correlacionaram BV/TV na μ CT e com a histomorfometria convencional nos ossos maxilares de humanos e comprovaram sua confiabilidade para determinar a densidade óssea e a microestrutura do osso alveolar dos maxilares (GONZALEZ-GARCIA, R.;MONJE, F., 2013).

A μ CT é hoje, amplamente utilizada em vários meios acadêmicos, inclusive no odontológico como na medição do dente e da espessura de esmalte, morfologia do canal radicular e avaliação da preparação do canal, estrutura e desenvolvimento craniofacial e óssea, biomecânica, engenharia de tecido, concentração mineral do dente, avaliação do osso periimplantar e osseointegração de implantes (SWAIN, M. V.;XUE, J., 2009).

A principal aplicação da μ CT na odontologia tem sido na análise do osso trabecular e tem se tornado o *gold standard* para análise quantitativa da arquitetura óssea (SWAIN, M. V.;XUE, J., 2009). Em um estudo sobre avaliação da estrutura do osso trabecular através μ CT comparado a da análise histológica mostrou que a precisão das medidas foi excelente, não mostrando diferença estatística entre as medidas de ambas, demonstrando sua aplicabilidade para tal análise (KUHN, J. L. et al., 1990).

Histomorfometria convencional X Micro-CT

Uma das grandes vantagens da μ CT é que o processo de obtenção da imagem não é destrutivo, portanto a estrutura interna da amostra mantém-se intacta, podendo ser examinadas quantas vezes for necessário o para testes biológicos e mecânicos adicionais. (BENTLEY, M. D. et al., 2002; GULDBERG, R. E. et al., 2003). Comparando com a histomorfometria convencional (HTM), que consiste na análise histológica das estruturas, há o tempo reduzido para análise, preservação da integridade do espécime e a possibilidade de realizar estudos bio mecânicos (SWAIN, M. V.;XUE, J., 2009). Aparelhos atuais da μ CT permitem a determinação de estruturas menores que $1,6\mu\text{m}$ e também possibilitam o cálculo de medidas tridimensionais sem a necessidade de assumir o modelo geométrico, que define a estereologia (GONZALEZ-GARCIA, R.;MONJE, F., 2013).

A excelente reprodutibilidade e acurácia das medidas da μ CT da morfologia óssea têm sido estabelecidas em alguns estudos. A acurácia dessas medidas tem sido avaliada através da comparação com HMF, tanto em animais (KAPADIA, R. D. et al., 1998; WAARSING, J. H. et al., 2004b; BONNET, N. et al., 2009) quanto em espécimes humanos (KUHN, J. L. et al., 1990; MULLER, R. et al., 1998; FANUSCU, M. I.;CHANG, T. L., 2004; CHAPPARD, D. et al., 2005). Esses estudos demonstram que as medidas da μ CT, tanto as bidimensionais quanto as tridimensionais são correlatas àquelas da HMF. Muller *et al.* reportou alta correlação ($r=0,84-0,92$) e pequenas diferenças entre os dois métodos para medidas de biópsias humanas de ilíaco (MULLER, R. et al., 1998).

Apesar de alguns estudos reportarem que a μ CT superestima a espessura das trabéculas, quando comparada a medidas da HMF, alguns aspectos devem ser discutidos: resolução inadequada, seleção errônea do *threshold*, uso de um modelo de placa para estimar a espessura trabecular na histomorfometria bidimensional comparada a métodos tridimensionais diretos da μ CT e/ou ao fato que as medidas tridimensionais da μ CT incluem interseções das trabéculas, que tende a aumentar os valores de espessura trabecular comparada com medidas apenas das hastes na HMF (CHAPPARD, D. et al., 2005). Portanto, as altas correlações entre as duas técnicas fornece uma forte base racional para o uso de μ CT para avaliar a morfometria esquelética (BOUXSEIN, M. L. et al., 2010).

Parâmetros ósseos da Micro-CT

Os parâmetros mais comumente usados na μ CT para descrever a quantidade óssea são similares àqueles usados na histomorfometria convencional como volume ósseo (BV), volume tecidual ou total (TV), densidade óssea volumétrica (BV/TV), definida como a fração do osso no volume total da amostra, superfície óssea/volume ósseo (BS/BV). A μ CT, além dos parâmetros comuns, aperfeiçoou a análise tridimensional quantitativa da morfologia do osso trabecular. Outros parâmetros que definem a estrutura do osso trabecular também são obtidos, como a espessura trabecular (Tb.Th); separação trabecular (Tb.Sp); número trabecular (Tb.N), que é o número de vezes que uma trabécula é cruzada por outras por unidade de comprimento; índice de modelo estrutural (SMI), que caracteriza a morfologia das trabéculas (haste/prato); fator de padrão trabecular (Tb.Pf), que indica a conectividade inversa; e grau de anisotropia (DA), que é caracterizada pelo grau de alinhamento trabecular (GONZALEZ-GARCIA, R.; MONJE, F., 2013). Os índices morfométricos que podem ser derivados das imagens tridimensionais da μ CT podem ser encontrados na tabela 6.

Tabela 6 - Definição e descrição dos resultados da análise da μ CT para a microarquitetura do osso trabecular

Parâmetros morfométricos	Abreviação	Unidade	Descrição
Volume ósseo	BV	μm^3	Volume da região segmentada considerada como osso
Volume tecidual	TV	μm^3	Volume de toda a região de interesse
Densidade óssea volumétrica	BV/TV	%	Razão entre volume do osso segmentado e o volume total da região de interesse
Superfície óssea/ volume ósseo	BS/BV	$1/\mu\text{m}$	Razão entre a superfície do osso segmentado para o volume ósseo segmentado
Fator de padrão trabecular	Tb.Pf	$1/\mu\text{m}$	Parâmetro de conectividade inversa
Índice de modelo estrutural	SMI		Indicador da estrutura trabecular. SMI perto de 0 com placas paralelas e de 3 para hastes cilíndricas
Espessura trabecular	Tb.Th	μm	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	$1/\mu\text{m}$	Medida do número médio de trabéculas transversais por unidade de comprimento
Separação trabecular	Tb.Sp	μm	Distância média entre as trabéculas, avaliadas pelo espaços ósseos
Porosidade total	Po(tot)	%	Volume de porosidade total
Densidade de conectividade	Conn.Dn	$1/\mu\text{m}^3$	Medida do grau de conectividade das trabéculas, mensurada pelo número redundante de conexões trabeculares por unidade de volume

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Objetivo geral:

- Identificar as alterações estruturais do osso sob efeito do AZ (Zometa, Novartis, São Paulo, SP, Brasil) por meio da μ CT, em ratos Wistar.

Objetivos específicos:

- Validar o modelo animal preconizado por Maahs et al para a indução de osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos em ratos.
 - Avaliar a utilização da μ CT como método para análise de alteração estrutural do osso sob efeito do AZ.
 - Comparação do volume tecidual, densidade óssea volumétrica, fator de padrão trabecular, volume tecidual, índice de modelo estrutural, espessura, número, separação e porosidade trabecular e a densidade de conectividade do osso trabecular de mandíbulas de ratos *Wistar* medicados com AZ.
-
-

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (protocolo 03/2013 – anexo A)

4.1 Seleção e análise da amostra

Foram utilizados 24 ratos machos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*) do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (FOB/USP), com 12 semanas de vida e peso aproximado de 300 gramas. Somente foram utilizados ratos machos para evitar a influência de variações hormonais. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, forradas com maravalha estéril, sob alimentação com ração sólida (Ração Ativada Produtor-Anderson & Clayton SA) e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos a uma temperatura ambiente média de 22° e iluminação artificial variando entre 5-60 Lux com ciclo claro-escuro 12 horas claro e 12 horas escuro, sendo o período da luz o das 6 às 18 horas. O local também apresentava sistema de exaustão de aproximadamente 15 trocas de ar por hora e umidade relativa de 45% a 74%.

4.1.1 Grupos Experimentais

Após 2 semanas de aclimatização, os 24 ratos foram numerados, pesados e separados em 2 grupos de modo aleatório, totalizando 12 ratos em cada grupo:

- Controle (GCO): animais que receberam cloreto de sódio 0,9% no mesmo volume que outras medicações (Figura 8A)
 - Medicados com AZ (GAZ): animais que receberam AZ (Zometa, Novartis, São Paulo, SP, Brasil) na dosagem de 0,6mg/kg (Figura 8B)
-

Fig. 8 - Soluções utilizadas. A) Cloreto de sódio 0,9% e B) Zometa (Ácido zoledrônico) 4mg/100ml

4.1.2 Procedimentos

A administração das soluções (cloreto de sódio 0,9% e AZ 0,6mg/kg) foi realizada intraperitonealmente a cada 28 dias em um total de 5 doses. A cada 28 dias os animais foram pesados novamente para novo cálculo das dosagens das soluções (Figura 9).

Fig. 9 - Organograma da administração das soluções

Para a injeção das soluções no abdômen dos animais, foi feita a contenção desses, colocando-se a mão sobre o dorso e a caixa torácica, e a cabeça sendo segurada com o polegar e o indicador. As injeções foram realizadas com uma seringa de 1mm, 13 x 0,45mm no quadrante inferior esquerdo evitando a perfuração de órgãos vitais (KRINKE, 2000, MAAHS et al 2011).

Os abdomens foram divididos em 4 quadrantes, com uma linha media e uma linha perpendicular passando pelo umbigo do rato, sendo as injeções realizadas no quadrante inferior esquerdo. Ângulo de 20-45°

4.1.3 Coleta e escaneamento das amostras

A eutanásia de todos os animais foi realizada 150 dias após o início do tratamento, sob sedação, por injeção intramuscular de dose excessiva de anestésico. As mandíbulas foram então desarticuladas e preparadas, removendo-se todo o tecido mole remanescente e armazenamento em formol 10% até a análise (Figura 10).

Fig. 10 - Mandíbulas desarticuladas com tecido mole removido. A) Vista lateral vestibular ; B) Vista lateral lingual

Anteriormente ao escaneamento da μ CT, radiografias periapicais foram realizadas (Yoshida Dental MFC Co. Ltd., Tóquio, Japão – 70kVp, 7ma, 0,17segundos de exposição e sensor Visualix Gendex/Dentsply, Milão, Itália). 2 espécimes de cada grupo, escolhidos de forma aleatória (Figura 11).

Fig. 11 - Radiografias dos grupos CO (A) e AZ (B). Observar discreto aumento da radiopacidade periapical e discreto espessamento da lamina dura no GAZ.

Os lados esquerdo das mandíbulas foram então seccionados 1cm anteriormente ao primeiro molar inferior e 1cm posteriormente ao último molar com baixa rotação e disco de carborundum estéril, removendo-se também parte do incisivo inferior (Figura 12) e posicionadas em um tubo de eppendorf de 1,5 ml, embebidas em formol 10% com a região de incisivos voltada para inferior (Figura 13).

Fig. 12 - Mandíbulas seccionadas, 1cm anteriormente e posteriormente aos molares. A) Vista lateral vestibular; B) Vista lateral lingual.

Fig. 13 - Mandíbula seccionada, embebida em formol 10% em tubo eppendorf posicionada o escaneamento da μ CT no interior do microtomógrafo

As amostras foram fixadas na plataforma do escâner com cera pegajosa e escaneadas no aparelho Skyscan 1174 (Skyscan, Bélgica, 50kv) (Figura 14) no protocolo:

- ângulo de rotação: 0.8 grau
- 180 graus de giro
- 2 frames
- 1024x1300 pixels
- voxel: 14.1 μ m voxel

Fig. 14 - Scanner 1174 da Skyscan utilizado na pesquisa
Fonte: www.bruker.com

Após escaneamento, foi realizada a reconstrução com o uso do software NRecon (Skyscan, Bélgica) (Figura 15), utilizado para fazer o ajuste fino da imagem. O registro das imagens foi realizado através do algoritmo MIRIT para padronização espacial da amostra (software desenvolvido na KULeuven, F. Maes et al, 1997) (Figuras 16 e 17) em um computador de alto desempenho (Optiplex 7010, Dell) e um monitor de alta resolução (Dell), apropriados para esse fim em sala escurecida.

Fig. 15 - Programa Nrecon para reconstrução dos volumes tomográficos; A) realizado a seleção axial da área a ser analisada; B) Ajuste de micro desalinhamento; C) Seleção da suavização adequada

Fig. 16 - Interface do programa MIRIT para padronização espacial da amostra nos três planos. A) Posição inicial após importação dos espécimes. Observa-se dois espécimes diferentes em posições distintas (um em tons de cinza e outro em alaranjado); B) Sobreposição dos diferentes espécimes, proporcionando a padronização espacial.

Fig. 17 - Interface do programa MIRIT demonstrando o resultado após a padronização espacial de duas amostras distintas. Posicionamento muito similar em todos os planos axial, sagital e coronal, respectivamente.

Após a padronização da amostra iniciou-se a análise da microestrutura através do software CtAn (Skyscan, Bélgica) (Figura 18). Determinamos uma região de interesse (ROI-region of interest) padronizada para todos os exames que abrangeu a maior região de trabeculado possível no ápice dos molares excluindo regiões anatômicas como canal mandibular, cortical óssea, ligamento periodontal e dente em área significativa que fosse cabível a todos os exames e a todas as secções do exame. O ROI selecionado compreendeu a área máxima adequada para todos os espécimes, a fim de utilizar o mesmo ROI para toda a amostra.

Fig. 18 - Interface do programa CtAn

Primeiramente, um ROI máximo foi selecionado para a primeira amostra, seguindo as considerações citadas acima. Então, este ROI máximo foi importado para o segundo espécime e foi readequada à anatomia do mesmo em todas as fatias, reduzindo-o, sem abranger as estruturas anatômicas supracitadas. Esta ação foi repetida em todas as reformatações de toda amostra (24 ratos), fazendo com que desta forma, ao final, criou-se um ROI apropriado para toda a amostra de ambos os grupos (Figura 19). E então foram avaliados na região de interesse estabelecida os seguintes fatores: TV, BV, BV/TV, Tb.Pf, SMI, Tb.N, Tb.Th, Tb.Sp, Tb.Pf, Po(tot), Conn.Dn os resultados foram comparados entre os grupos controle e droga.

Fig. 19 - A) Primeiro ROI com a área máxima de osso trabecular excluindo o molar, incisivos, osso cortical e canal mandibular (CM); B) ROI final, adequado a todas as amostras para permitir a análise padronizada com o mesmo ROI em ambos os grupos (em vermelho).

Após o registro da amostra, as imagens foram segmentadas usando o algoritmo de limiar adaptativo (NACKAERTS, O. et al., 2014) para permitir que a estrutura óssea trabecular seja quantificada com software CTAnalyser (SkyScan, Antuérpia, Bélgica) (Figura 20).

Fig. 20 - Imagem sagital da μ CT nas 3 diferentes janelas do programa CtAn: A) Imagem original; B) Seleção do ROI (em vermelho); C) Imagem binarizada

4.2 Análise estatística

Os testes foram executados pelo software Statistica for Windows® Software (5.1, Stat Soft, Tulsa, Oklahoma, USA). Os resultados serão analisados por meio de estatística descritiva e do Tete “T”, ao nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Vinte e quatro ratos *Wistar* machos de 12 meses de idade, de aproximadamente 300g foram analisados, sendo 12 em cada grupo. Somente foram utilizados ratos machos para evitar a influência de variações hormonais.

Anteriormente à análise, a reconstrução dos volumes foi realizada pelo software Nrecon. Os valores utilizados para o ajuste fino de suavização e micro desalinhamento encontram-se no anexo 2, com valor médio de 6,3 para o ajuste de suavização e -8 para o de micro desalinhamento.

A quantificação dos parâmetros da μ CT, realizada no software CtAn, depende da seleção do *threshold*. É ela que determina a sensibilidade da imagem binarizada. A definição dos valores do *threshold* foi local, com os valores que melhor se adequaram a cada espécime. Os valores do *threshold* do GCO e do GAZ estão, respectivamente, nos anexos 3 e 4. Os valores médios para ambos os grupos foi de valor mínimo 69,71 e valor máximo 155,92.

A análise visual 2D (Figura 21) e 3D (Figura 22) demonstrou redução dos espaços trabeculares e aumento da osteoesclerose no GAZ quando comparado ao GCO.

Fig. 21 - Imagens sagitais da μ CT (original, seleção do VOI, segmentação e resultado binário) da mandíbula na região periapical do primeiro molar de CO e AZ mostrando redução do espaço de medula óssea na região entre as raízes.

Fig. 22 - O modelo 3D do volume da área analisada, a partir de, respectivamente: A) o GCO e B) GAZ mostrando aparente mais osteosclerose. Em vermelho evidencia-se o ROI.

Os resultados quantitativos dos parâmetros analisados pela μ CT no GCO e no GAZ encontram-se, respectivamente, nos anexos 5 e 6. Gráficos de cada um dos parâmetros morfométricos, de comparação entre os dois grupos podem ser visualizados nos gráficos 1 a 11. Nós podemos observar que a média TV é o mesmo em ambos. BV e BV/TV foi maior no GAZ. Além disso, mostrou valores mais elevados para a BS/BV no GCO. Em nossa análise, o GAZ apresentou menor média Tb.Pf. SMI foi maior no GCO. Tb.Th foi maior em GAZ e Tb.Sp foi inferior em comparação com o GCO. O número foi ligeiramente inferior na GAZ. Nosso estudo também mostrou Po (tot) maior no GCO do que em GAZ.

Gráfico 1- Valores dos grupos CO e AZ para volume tecidual (TV)

Gráfico 2- Valores dos grupos CO e AZ para volume ósseo (BV)

Gráfico 3- Valores dos grupos CO e AZ para densidade óssea volumétrica (BV/TV)

Gráfico 4- Valores dos grupos CO e AZ para superfície óssea/ volume ósseo (BS/BV)

Gráfico 5 - Valores dos grupos CO e AZ para fator de padrão trabecular (Tb.Pf)

Gráfico 6 - Valores dos grupos CO e AZ para índice de modelo estrutural (SMI)

Gráfico 7- Valores dos grupos CO e AZ para espessura trabecular (Tb.Th)

Gráfico 8- Valores dos grupos CO e AZ para número trabecular (Tb.N)

Gráfico 9- Valores dos grupos CO e AZ para separação trabecular (Tb.Sp)

Gráfico 10- Valores dos grupos CO e AZ para porosidade total (Po(tot))

Gráfico 11– Valores dos grupos CO e AZ para densidade de Conectividade (Conn.Dn)

A comparação entre os dois grupos pelo teste "t-student" mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), com exceção de Tb.N e TV em todos os fatores (tabela 7). Isto significa que todos os parâmetros morfométricos analisados são estatisticamente diferentes entre os dois grupos, com exceção de Tb.N e TV, que são semelhantes.

Tabela 7 - Média e desvio padrão dos parâmetros morfométricos e valor de p para comparação entre grupos pelo teste de "t student". Em vermelho $p < 0,05$, valores estatisticamente significativos

Parâmetros (unidade)	Média CO	Média AZ	valor t	Desvio padrão CO	Desvio Padrão AZ	P
TV (pixel ³)	990006,4	990006,4		0	0	
BV (pixel ³)	419568	618292,5	-4,94921	83291,96	111397,6	0,0001
BV/TV (%)	42,38033	62,45339	-4,94921	8,413274	11,25221	0,0001
BS/BV (1/pixel)	0,463623	0,333078	5,96745	0,060774	0,045269	0,0000
Tb.Pf (1/pixel)	0,154852	0,101746	4,672123	0,02925	0,026359	0,0001
SMI	2,139767	1,895213	2,622604	0,201711	0,252302	0,0155
Tb.Th (pixel)	10,01596	14,35288	-5,75414	1,552996	2,098824	0,0000
Tb.N (1/pixel)	0,04251	0,043477	-0,4658	0,006026	0,00392	0,6459
Tb.Sp (pixel)	17,19183	15,81196	2,725188	0,883563	1,515218	0,0124
Po(tot) (%)	57,61967	37,54661	4,949208	8,413274	11,25221	0,0001
Conn.Dn (1/pixel ³)	0,000423	0,000297	4,535982	8,04E-05	5,38E-05	0,0002

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O efeito dos BF na microestrutura do trabeculado ósseo ainda é pouco esclarecido. No presente estudo, avaliamos os efeitos do AZ no trabeculado ósseo através da μ CT em modelo animal, com o intuito de entender melhor os seus mecanismos.

6.1 Modelo Animal

O uso de um modelo animal se fez necessário para que se possa estudar a correlação entre BF e o aparecimento da OMAB. Alguns estudos conseguiram mimetizar as características clínicas da OMAB em alguns modelos animais, porém pouco ainda foi estudado sobre o efeito dos BF na microestrutura trabecular nos maxilares através da μ CT.

A fisiopatologia precisa dos BF em OMAB ainda não está clara, também, devido à ausência de um modelo animal bem estabelecido. Alguns modelos animais de BF foram descritos na literatura (SONIS, S. T. et al., 2009; AGUIRRE, J. I. et al., 2010; HOKUGO, A. et al., 2010; LOPEZ-JORNET, P. et al., 2010; SENEL, F. C. et al., 2010; YAMASHITA, J. et al., 2011; JABBOUR, Z. et al., 2014). Um modelo estabelecido é essencial para ajudar a determinar a fisiopatologia da OMAB e, portanto, poderia definir gestão e prevenção na área clínica. No estudo atual, tivemos como objetivo, conhecer o efeito da BF na microarquitetura do osso da mandíbula de ratos por meio de μ CT.

Estudos em cachorros com alendronato por VO e AZ por via IV não mostraram o aparecimento clínico de lesões tipo OMAB, mas conseguiram demonstrar microscopicamente um tecido desvitalizado (ALLEN, M. R.; BURR, D. B., 2008). Entretanto, estudos em cachorros possuem alto custo e são difíceis de serem realizados pela grande demanda de material, além da opinião pública, atualmente discutida no país (ZEN FILHO, E. V., 2014).

O remodelamento ósseo depende do equilíbrio contínuo entre a reabsorção e formação óssea. Quando este balanço é perturbado, patologias podem ocorrer (DEPYPERE, M., 2013). Os estudos que correlacionam OMAB e BF através da μ CT são ainda raros. Para estudo da patofisiologia, mecanismos de patologias ósseas e mecanismo de fármacos em humanos, ratos e camundongos têm se tornado o modelo de animais de pequeno porte de preferência, por várias razões: ratos e outros roedores são geneticamente e patofisiologicamente similares a humanos; Ratos possuem um período reprodutivo relativamente curto, acelerando a criação e reduzindo os custos de manutenção; Todo o genoma do rato foi sequenciado em 2002, tornando-se a segunda espécie de mamífero após o ser humano a ter seu DNA sequenciado (DEPYPERE, M., 2013).

Estudo em ratos possui grandes vantagens, pois são animais de fácil manipulação, nos quais, se consegue estudar os mecanismos envolvidos no aparecimento da OMAB em tempo bem inferiores a 1 ano. Senel et al. (2010) conseguiram demonstrar aparecimento de lesões do tipo OMAB de forma espontânea com o uso de AZ em altas dosagens (SENEL, F. C. et al., 2010). Hokugo et al. (2010) descreveram o aparecimento de 14% de OMAB dos ratos submetidos a cirurgia de extração dentária, que estavam sob administração de AZ por via IV por um período de 10 semanas.

Ratos Wistar são conhecidos por simular a resposta nos seres humanos, salvo restrições inerentes e peculiaridades da espécie; portanto, o presente estudo foi realizado em ratos Wistar. A dose da droga usada no nosso estudo foi baseada em Maahs et al (2011) (MAAHS, M. P. et al., 2011). Os animais do GAZ receberam 5 doses de 0,6 mg / kg, intraperitonealmente, com intervalos de 28 dias e, o GCO, recebeu a mesma dose de cloreto de sódio a 0,9%. O estudo de Maahs demonstrou 80% dos animais no GAZ com OMAB e 0 % dos animais nos grupos de CO. Esses achados confirmam a associação entre osteonecrose e o uso de AZ, já demonstrado em alguns estudos clínicos, o alendronato foi também testado neste estudo e OMAB foi demonstrada em nenhum da amostra de alendronato (MARX, R. E., 2003; MIGLIORATI, C. A., 2003; RUGGIERO, S. L. et al., 2004; MIGLIORATI, C. A. et al., 2005a; PURCELL, P. M.;BOYD, I. W., 2005; MAAHS, M. P. et al., 2011)..

Há autores que defendem o uso de doses mais elevadas dos BF em modelos animais (HUANG, R. C. et al., 2005), considerando-se o fato de que a eliminação da droga é mais rápida em ratos do que em humanos (MAAHS, M. P. et al., 2011). É possível que as doses mais elevadas sejam capazes de induzir osteonecrose, bem como outras patologias. No entanto, a dose escolhida por Mahhs e seguida por nós, baseou-se na dose terapêutica prescrita para os seres humana e ajustada de acordo com as taxas metabólicas dos roedores para o período mais longo de tratamento (LEHMAN, R. A., JR. et al., 2004).

Deve-se ressaltar que, na prática clínica, AZ é comumente administrado por via IV, enquanto que em nosso estudo, os animais foram tratados por injeção intraperitoneal, devido à sua facilidade e gestão da segurança. A administração intraperitoneal nas concentrações plasmáticas é mais baixa do que IV (MAAHS, M. P. et al., 2011). Existem alguns estudos também usando AZ intraperitonealmente, entretanto, as doses variam muito entre eles (OTTEWELL, P. D. et al., 2008). Foram dados aos ratos AZ a 0,1 mg / kg / semana, por via intraperitoneal, durante 6 semanas, que é equivalente à dose de 4mg humano. 0,6 mg / kg. Esta dosagem pode ser considerada elevada em alguns casos, no entanto, foi administrada mensalmente.

Recentemente, alguns estudos demonstraram cicatrização retardada com ulceração da mucosa e sequestro ósseo após a extração do dente maxilar em ratos que receberam AZ e terapia de combinação com dexametasona (SONIS, S. T. et al., 2009; BI, Y. et al., 2010; KIKUIRI, T. et al., 2010). Diferente do modelo de extração de dente, o mais utilizado, Agahloo et al (2011) desenvolveram um modelo OMAB relacionada à doença periodontal agressiva e provou que a doença periodontal e terapia BF potente são suficientes para o desenvolvimento OMAB (AGHALOO, T. L. et al., 2011). O modelo animal utilizado no presente trabalho segue a descrição por Maahs et al. (2011), que conseguiu melhor mimetizar lesões tipo OMAB, relatando uma prevalência de 80% de OMAB, sob administração intraperitoneal de AZ, em exames de microscopia óptica (MAAHS, M. P. et al., 2011). As pesquisas supracitadas, foram muito significativas, uma vez que permitiram a adaptação de um modelo animal da OMAB com claras vantagens para futuros estudos que utilizam as ricas ferramentas experimentais e vantagens genéticas de modelos de ratos.

6.2 Micro-CT

A μ CT é uma valiosa ferramenta para visualização de estruturas tridimensionais internas de pequenos objetos. Ela permite que analisemos detalhadamente a estrutura tridimensional do osso, tanto de biópsias humanas quanto de modelos experimentais. É uma técnica não destrutiva, que possibilita que a amostra fique disponível para novas análises com técnicas complementares. (DEPYPERE, M., 2013).

Por essa técnica, reconstruções bi e tridimensionais e também reconstruções volumétricas podem ser obtidas com muitas vantagens quando comparadas à histomorfometria convencional, como a preservação da integridade do espécime e rapidez na análise, sendo considerado o novo padrão ouro na avaliação de estrutura óssea (SWAIN, M. V.;XUE, J., 2009).

Os *scanners* tomográficos clínicos geralmente produzem imagens compostas por 1 mm³ de voxel (*volume elements*), enquanto que a Tomografia microcomputadorizada de raios X conhecida como μ CT, varia de 5-50 μ m, aproximadamente 1.000.000 vezes menor que o volume da CT clínica (FELDKAMP, L. A. et al., 1989; KUHN, J. L. et al., 1990). A intensidade de imagem da μ CT representa atenuação de Raio x, proporcionando contraste especialmente adequado para a discriminação de osso de tecido mole em pequenos animais. Com a resolução de poucos μ m, μ CT ex vivo é capaz de estudar a delicada estrutura do osso trabecular de rato. As estruturas podem ser inspecionados visualmente em 2D e exames quantitativos podem ser obtidos por parâmetros morfométricos (DEPYPERE, M., 2013), como usado em nossa pesquisa. Com a evolução dos sistemas da μ CT, hoje é possível até realizar estudos *in vivo* de alta resolução em animais de pequeno porte e possibilitam a determinação de estruturas menores que 1.6 μ m e estudos longitudinais da amostra (GULDBERG, R. E. et al., 2003).

Recentemente, a μ CT tem sido implementada em vários estudos para investigar a estrutura óssea, além de fornecer informações diretas sobre a densidade mineral óssea, parâmetros como a espessura do córtex do osso trabecular e separação, entre outros. Pouco se sabe sobre o efeito dos BF na micro

estrutura óssea. Portanto, o objetivo deste estudo foi conhecer os efeitos do AZ na microestrutura óssea da mandíbula de ratos.

Uma das grandes vantagens é que o processo de obtenção da imagem não é destrutivo, portanto as estruturas internas da amostra podem ser examinadas muitas vezes e a amostra continua disponível após escaneamento para testes biológicos e mecânicos adicionais. Comparando com a histomorfometria convencional, que consiste na análise histológica das estruturas, há o tempo reduzido para análise, preservação da integridade do espécime e a possibilidade de realizar estudos bio mecânicos (González-Garcia 2012).

Anteriormente, o padrão ouro tradicional para a avaliação de estruturas internas do osso era a análise histológica. A histologia permite por métodos celulares específicos e pela coloração de tecidos a avaliação microscópica bidimensional. O procedimento histológico, tipicamente consiste na incorporação, secção e coloração dos tecidos a serem analisados. Para a visualização de depósitos de cálcio na matriz óssea, o protocolo de von Kossa é aplicado (WAARSING, J. H. et al., 2004a). As secções são hidratadas para melhorar a penetração do corante no tecido. A fatia é inundada com nitrato de prata e deixada em repouso sob luz solar direta durante uma hora, durante este processo, a prata atribui-se aos sais de cálcio e à luz solar reduz a prata em uma cor castanha escura ou preta. O resultado é uma coloração do cálcio e, consequentemente, do osso mineralizado (DEPYPERE, M., 2013).

Pela análise histológica e histomorfométrica ser muito demorada, tipicamente, as características do tecido são quantificadas em 3-5 secções de um osso longo. Índices morfométricos globais convergem da análise dessas secções para um valor nominal (REVELL, P. A., 1983). A histologia fornece imagens de alta resolução 2D de uma variedade de tecidos e células ósseas. É um método destrutivo, a excisão do osso do animal e preparo, torna a amostra de osso indisponível para outros métodos de análise. Além disso, fornece apenas informações 2D de estruturas internas e 3D das estruturas ósseas (DEPYPERE, M., 2013), diferente da técnica da μ CT utilizada em nossa pesquisa.

A μ CT é hoje, amplamente utilizada em vários meios acadêmicos, inclusive no odontológico como na medição do dente e da espessura de esmalte, morfologia do canal radicular e avaliação da preparação do canal, estrutura e desenvolvimento craniofacial e óssea, biomecânica, engenharia de tecido, concentração mineral do dente, avaliação do osso peri implantar e osseointegração de implantes (SWAIN, M. V.;XUE, J., 2009). Mas a principal aplicação da μ CT na odontologia tem sido na análise do osso trabecular e tem se tornado o padrão ouro para análise quantitativa da arquitetura óssea. Um estudo sobre avaliação da estrutura do osso trabecular através μ CT comparado a da análise histológica mostrou que a precisão das medidas foi excelente, não mostrando diferença estatística entre as medidas de ambas (KUHN, J. L. et al., 1990).

Imagens da μ CT de estruturas ósseas internas permitem uma interpretação visual das características ósseas, já as medidas quantitativas possibilitam avaliação mais minuciosa. A análise tridimensional quantitativa da morfologia do osso trabecular tem sido aperfeiçoada com a μ CT. Parâmetros como espessura, número, separação das trabéculas, volume ósseo, volume do tecido total, fração do volume do osso trabecular, índice do modelo estrutural (trabéculas em forma de haste/prato), conectividade trabecular, número de nós por volume de tecido e densidade óssea relacionado a hidroxiapatita padrão podem ser mensurados (SWAIN, M. V.;XUE, J., 2009).

A resolução de uma imagem μ CT reconstruída depende das propriedades do sistema, das configurações de aquisição, e as configurações de reconstrução. As propriedades do sistema de escaneamento que influenciam a resolução são: o tamanho do ponto focal do tubo de raio X, a geometria do sistema, o fator de zoom, o tamanho do elemento detector, e a interferência entre elementos detectores. Em geral, os scanners com rotação da amostra oferecem uma melhor resolução do que aquelas com um tubo e câmara rotativos. As propriedades do sistema são inerentes ao scanner utilizado e manifestam-se em dados da projeção, causando artefatos na imagem reconstruída. As definições de aquisição que influenciam a resolução da imagem são a quantidade de ângulos de projeção adquiridas e o fator de zoom, o qual é ajustável para determinados scanners. As configurações de reconstrução como o tamanho da imagem de voxel e os filtros de reconstrução utilizados nas técnicas retrógradas podem alterar a resolução da imagem (DEPYPERE, M., 2013).

O aparelho Skyscan 1174, utilizado na pesquisa, possui a amostra em movimento com tubo e câmara estáticos, como recomendado. O protocolo utilizado foi: ângulo de rotação: 0.8 grau; 180 graus de giro; 2 frames; 1024x1300 pixels; voxel: 14.1µm voxel.

Algumas orientações devem ser seguidas para a aquisição da imagem. Os primeiros passos na aquisição da imagem envolvem preparação e posicionamento da amostra. A preparação da amostra varia de acordo com o espécime a ser escaneado. Por exemplo, neonatos devem ser escaneados intactos, enquanto que espécimes de animais mais velhos deverão ter o tecido mole removido (BOUXSEIN, M. L. et al., 2010), como realizado na presente pesquisa. Os espécimes devem estar alinhados com o eixo vertical do scanner, o alinhamento com o eixo horizontal também é possível. O uso de espuma de baixa densidade ou outro material não atenuante é útil para posicionar o espécime firmemente, pois é de extrema importância para a qualidade do exame que não haja nenhum movimento do espécime durante a aquisição (BOUXSEIN, M. L. et al., 2010), neste estudo, as amostras foram alinhadas com o eixo vertical do escaner sem uso de material não atenuante. Na base do suporte da amostra foi utilizada cera pegajosa para maior fixação.

É possível que os espécimes escaneados estejam embebidos em vários meios, incluindo o salino, etanol, formalina, assim como nenhum meio como o ar. O escaneamento em ar origina o melhor contraste entre o espécime e área adjacente e deve ser usada em algumas situações. Já as soluções para escaneamento afetam significativamente a atenuação do Raio X, com medidas significativamente diferentes dos valores onde o meio de ar é utilizado (NAZARIAN, A. et al., 2008). Recomenda-se que sempre que as medições quantitativas de densidade mineral dos tecidos moles sejam feitas, digitalizar os espécimes em meio líquido e recomenda-se também utilizar o mesmo meio e volume para todas as amostras que estão a ser comparadas (BOUXSEIN, M. L. et al., 2010). Nesta pesquisa foi utilizado o meio de formol 10% no mesmo volume para todas as amostras.

O método padrão de descrever quantitativamente a arquitetura óssea é o cálculo de índices morfométricos. Índices morfométricos são calculados a partir de uma imagem binária contendo voxels só osso e voxels não-osso. Para obter esta

imagem binária, as imagens tomográficas de histologia ou micro têm que ser segmentadas (BOUXSEIN, M. L. et al., 2010).

A segmentação consiste na seleção da área a ser analisada. A segmentação é uma etapa crítica na análise, um erro pode acarretar um impacto sistemático nos resultados subsequentes. Outra questão importante na segmentação relaciona-se com o contorno empregue para definir a área em cada fatia a ser incluído para segmentação e posteriormente, nas medidas morfológicas. O método mais fácil seria a criação de uma área circular ou retangular que englobe a área de interesse. Entretanto, esse método não possibilita a separação dos ossos cortical e trabecular e a área externa é incluída, atrapalhando as medidas. O contorno mais preciso para regiões do osso cortical e trabecular deve ser garantido e pode ser alcançado manualmente com um método fatia por fatia ou usando algoritmos automatizados. Há várias abordagens para delinear a região trabecular, como um ROI uniforme, um contorno irregular anatômica adjacente à superfície endocortical, ou um contorno anatômico irregular alguns pixels longe do limite endocortical (BOUXSEIN, M. L. et al., 2010).

No presente trabalho não foi possível utilizar o contorno circular ou retangular padrão, pois diferente dos ossos longos, que são os ossos mais utilizados nessas pesquisas, a mandíbula de ratos é mais complexa, pois possui estruturas que devem ser desprezadas como os elementos dentários (molares e incisivos) e o canal mandibular. Portanto, utilizamos um ROI irregular, adaptativo para toda a amostra. Ele foi desenvolvido criando-se um ROI abrangente para o primeiro rato, fatia por fatia evitando as estruturas, depois foi se limitando a área para que o ROI seja o mesmo para toda a amostra. Devemos salientar que só foi possível a importação do mesmo ROI para toda a amostra, pois anteriormente a este passo, realizamos a padronização espacial com o software MIRIT.

Uma vez que a região a ser analisada foi delimitada, deve-se escolher a sensibilidade do *threshold*. O *threshold* é o valor de intensidade, geralmente realizado pela imagem binarizada, que representa o valor de cinza mínimo e máximo para ser considerado um voxel de algum tecido (DEPYPERE, M., 2013), neste caso, o osso. O método mais simples é o *threshold* global que aplica o mesmo valor de *threshold* para todo voxel nos diferentes exames. O limiar global é muitas vezes

determinado selecionando visualmente um limiar adequado, mas os métodos de seleção de threshold automático também existem. Quando a resolução sinal/ruído é alta, como a histologia e uCT imagens ex vivo, a segmentação pode ser realizada pelo threshold global (DEPYPERE, M., 2013). Entretanto, em alguns casos, um único threshold global pode não ser adequado. Portanto, em alguns casos, é necessário usar segmentação mais sofisticada, incluindo threshold específico para cada espécime. Nesta pesquisa, optamos por realizar o threshold específico para cada espécime. Como um único threshold é inadequado para imagens de baixa qualidade, threshold local ou adaptativo define um limite de diferença em cada voxel. O threshold pode ter áreas adaptadas em cada voxel para corrigir a intensidade da vizinhança de um voxel (DEPYPERE, M., 2013). Optamos pela seleção do threshold de forma visual e não generalizada para todos os volumes para que a análise fosse realizada de forma mais personalizada.

O conjunto de índices morfométricos mais importantes para a análise do osso trabecular, segundo Depypere et al. (2013) são: densidade óssea volumétrica (BV/TV), que é a razão entre volume do osso segmentado e o volume tecidual total da região de interesse; espessura trabecular (Tb.Th), a média da espessura das trabéculas de toda a estrutura; separação trabecular (Tb.Sp), que é a distância média entre as trabéculas; número trabecular (Tb.N), que é a medida do número médio de trabéculas transversais por unidade de comprimento; e densidade de conectividade (Conn.D), que é a medida do grau de conectividade das trabéculas. Todos esses fatores e outros foram avaliados em nossa pesquisa.

Em nossa análise, o GAZ demonstrou menor média de fator de padrão trabecular. Valores menores significam melhor conexão entre as trabéculas, enquanto maiores médias significam uma estrutura trabecular mais desconectada. O nosso estudo mostrou que, no GAZ, o padrão trabecular é mais conectado do que no GCO.

Podemos observar que a média TV foi quase o mesmo em ambos, confirmando que o mesmo volume ROI foi analisado em todas as amostras. BV e BV/TV foi maior no GAZ mostrando mais volume ósseo, concordando com a literatura (AGHALOO, T. L. et al., 2011; WU, Y. et al., 2013). Além disso, mostrou valores mais elevados para a BS/BV no GCO. BS/BV é a razão entre a superfície

sólida com o volume medido em 3D dentro do ISV; que caracteriza a espessura e complexidade das estruturas.

SMI indica a prevalência relativa de hastes e placas em uma estrutura em 3D como o osso trabecular. Uma trabécula ideal, cilindro e esfera têm valores SMI de 0, 3 e 4, respectivamente (inversamente, cilíndrico e cavidades esféricas têm SMI de -3 e -4). Em nossa análise, GCO apresentou valores de 2,0827 e GAZ, 1,9363, que significam que nós poderíamos encontrar mais formas cilíndricas que em esfera.

Sobre a qualidade das trabéculas, no GAZ, o número trabecular foi discretamente maior, não estatisticamente significativo, quando comparadas ao GCO. Demonstrando que no GAZ possui um número semelhante de trabéculas.

Ainda sobre a qualidade de trabéculas no GAZ, Tb.Th foi maior e Tb.Sp foi inferior em comparação com o GCO, demonstrando que o grupo tem trabéculas mais espessas e mais grossas e menor separação entre elas. O número foi um pouco menor no GAZ. Nosso estudo também mostrou Po (tot) maior no GCO do que em GAZ.

Em nossa análise, o GAZ apresentou menor média Tb.Pf. Tb.Pf é um índice inverso de conectividade. Valores menores significam maior conexão entre as trabéculas, enquanto maiores médias significam uma estrutura trabecular mais desconectada (HAHN, M. et al., 1992). O padrão trabecular em AZ está mais ligado do que no GCO.

A comparação entre os dois grupos pelo teste "t" mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para todos os fatores, com exceção dos fatores Tb.N e TV em todos os fatores. Isto significa que todos os parâmetros morfométricos analisados são diferentes entre os dois grupos, com exceção de Tb.N e TV. TV possui números iguais entre os dois grupos, mostrando que o volume de tecido total analisado foi o mesmo em toda a amostra. Valores de Tb.N foram similares, mostrando que o efeito do BF é principalmente sobre a estrutura das trabéculas e não em seu número. Podemos observar as diferenças nos dois grupos da área segmentada no modelo 3D (figura 21).

Nosso estudo demonstrou que há alterações significativas na estrutura trabecular por uso de BF. As trabéculas são mais espessas, menos separadas e com melhores ligações em GAZ comparado com o GCO. Isso demonstra presença de osso mais esclerosado e menos vascularizado. Esta pesquisa demonstra que o AZ provoca mudanças significativas na estrutura trabecular. Isso tem uma consequência direta na cicatrização óssea e pode causar a necrose uma vez que uma intervenção esteja prevista no osso.

Osteócitos são envolvidos na mineralização e remodelação óssea, eles orquestram o delicado equilíbrio entre a atividade dos osteoclastos e osteoblastos. Sob condições saudáveis, o osso sofre remodelação contínua para se adaptar às exigências, através de um delicado equilíbrio entre a reabsorção e formação, a qual é realizada por osteoclastos e osteoblastos respectivamente (HESSE, B. et al., 2014). A ação dos BF baseia-se na redução da reabsorção óssea através da inibição da atividade dos osteoclastos. Nossa pesquisa mostrou que não houve mudança no número de trabéculas, e sim na sua composição, demonstrando maior depósito de osso nas trabéculas com menor separação entre elas no GAZ quando comparado ao GCO, isso ao longo do tempo vai gerando o osso desvitalizado e consequentemente, o osso necrótico.

Alguns estudos sob diferentes métodos também realizaram a avaliação do osso sob efeito do AZ através da μ CT. Aghaloo et al. (2011) induziu a OMAB com o uso de AZ e doença periodontal e a avaliou através do software Dolphin Imaging (Chatsworth, CA) com medidas lineares de perda óssea e do osso cortical (AGHALOO, T. L. et al., 2011). Seus resultados demonstraram maior espessamento do osso cortical no grupo medicado. Aghaloo et al. 2011 realizou medidas lineares em planos da microCT, diferente do presente estudo que analisou parâmetros morfométricos do osso trabecular de forma volumétrica.

Jabbour et al. (2014), realizaram um trabalho semelhante, eles avaliaram o impacto da administração concomitante do AZ e dexametasona após extração dentária. Essa análise foi realizada avaliando o BV/TV através da μ CT e provou que o tratamento combinado dos dois medicamentos inibe a remodelação óssea e aumenta a formação de sequestros ósseos (JABBOUR, Z. et al., 2014). Em nossa pesquisa, outros parâmetros morfométricos importantes para a análise da

microestrutura óssea foram analisados, além do BV/TV, como o BV, TV, BS/BV, Tb.Pf, SMI, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp, Po(tot), Conn.Dn. Outra diferença significativa entre os estudos foi a seleção do ROI. Enquanto que na pesquisa de Jabbour et al. (2014), foi realizada a seleção do osso incluindo o osso cortical e o osso trabeculado, na nossa pesquisa foi realizada com um ROI único para toda amostra em que só foi incluída o osso trabecular, excluindo áreas que poderiam influenciar no resultado como o osso cortical, canal mandibular e dentes.

Wu et al. 2013 investigaram o efeito dos bisfosfonatos em um modelo animal de osteoporose secundariamente a ovariectomia através da μ CT. O estudo foi realizado em vértebras de ratos com uso da μ CT *in vivo* e provaram aumento do BV do grupo medicado, e valores similares para Tb.Th entre os grupos (WU, Y. et al., 2013). Nossa pesquisa, realizada em mandíbulas de ratos em aparelho μ CT *ex vivo*, também demonstrou aumento do BV, mas diferente da pesquisa de Wu et al (2013), houve aumento estatisticamente significativo dos valores de Tb.Th para o GAZ.

Nossa pesquisa consistiu em um trabalho de metodologia singular que mostrou as mudanças no trabeculado ósseo após administração de AZ através da μ CT. O conhecimento do efeito dos BF na microarquitetura óssea pode ajudar a compreender a etiopatogênia de OMAB e promover desenvolvimento de protocolos de tratamento. À medida que é disponibilizada nova informação sobre o assunto, melhor entendimento sobre a etiopatogênia da doença e desenvolvimento de protocolos de tratamento, baseados em evidências clínicas serão realizados. Mais pesquisas neste campo são necessárias para encontrar respostas a muitos aspectos que permanecem obscuros ajudaria o uso adequado dessas drogas.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- O modelo animal utilizado (MAAHS, M. P. et al., 2011) foi efetivo para induzir alterações estruturais no trabeculado ósseo de mandíbulas de ratos *Wistar*.
 - O GAZ apresentou na maioria dos fatores investigados quando comparados ao GCO, com exceção de valores semelhantes para volume tecidual e de número trabecular.
 - Dentre os fatores avaliados, o GAZ apresentou as maiores médias para as seguintes variáveis: volume ósseo, densidade óssea volumétrica, espessura trabecular, quando comparado ao GCO.
 - Este mesmo grupo apresentou os menores valores médios para superfície óssea, padrão trabecular, índice de modelo estrutural, separação trabecular, porosidade total, densidade de conectividade.
 - A μ CT mostrou-se um método viável para quantificar o osso sob efeito do AZ, com a metodologia estabelecida neste trabalho.
 - Podemos concluir com os resultados de nossa pesquisa que, o efeito do AZ na microestrutura óssea é principalmente sobre a estrutura das trabéculas e não em seu número. Não houve aumento significativo no número de trabéculas, e sim na sua composição, demonstrando maior depósito de osso nas trabéculas com menor separação entre elas no GAZ quando comparado ao GCO.
-

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADAMSON, B. B. et al. Mineralisation defects with pamidronate therapy for Paget's disease: Secondary Mineralisation defects with pamidronate therapy for Paget's disease. **Lancet**, , v. 342, n. 8885, p. 1459-1460, Dec 11. 1993.

AGHALOO, T. L. et al. Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat: Secondary Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. **J Bone Miner Res**, , v. 26, n. 8, p. 1871-1882, Aug. 2011.

AGUIRRE, J. I. et al. Effects of alendronate on bone healing after tooth extraction in rats: Secondary Effects of alendronate on bone healing after tooth extraction in rats. **Oral Dis**, , v. 16, n. 7, p. 674-685, Oct. 2010.

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

ALLEN, M. R.; BURR, D. B. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data: Secondary The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. **Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, , v. 67, n. 5 Suppl, p. 61-70, May. 2009.

ALTUNDAL, H.; GURSOY, B. The influence of alendronate on bone formation after autogenous free bone grafting in rats: Secondary The influence of alendronate on bone formation after autogenous free bone grafting in rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, , v. 99, n. 3, p. 285-291, Mar. 2005.

ARCE, K. et al. Imaging findings in bisphosphonate-related osteonecrosis of jaws: Secondary Imaging findings in bisphosphonate-related osteonecrosis of jaws. **J Oral Maxillofac Surg**, , v. 67, n. 5 Suppl, p. 75-84, May. 2009.

ASTRAND, J.; ASPENBERG, P. Systemic alendronate prevents resorption of necrotic bone during revascularization. A bone chamber study in rats: Secondary Systemic alendronate prevents resorption of necrotic bone during revascularization. A bone chamber study in rats. **BMC Musculoskelet Disord**, , v. 3, n. 19, Aug 7. 2002.

BADROS, A. et al. Osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma patients: clinical features and risk factors: Secondary Osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma patients: clinical features and risk factors. **J Clin Oncol**, , v. 24, n. 6, p. 945-952, Feb 20. 2006.

BAGAN, J. V. et al. Avascular jaw osteonecrosis in association with cancer chemotherapy: series of 10 cases: Secondary Avascular jaw osteonecrosis in association with cancer chemotherapy: series of 10 cases. **J Oral Pathol Med**, , v. 34, n. 2, p. 120-123, Feb. 2005.

BASSETT, C. A. et al. Diphosphonates in the treatment of myositis ossificans: Secondary Diphosphonates in the treatment of myositis ossificans. **Lancet**, , v. 2, n. 7625, p. 845, Oct 18. 1969.

BEDOJNI, A. et al. Bisphosphonate-associated jawbone osteonecrosis: a correlation between imaging techniques and histopathology: Secondary Bisphosphonate-associated jawbone osteonecrosis: a correlation between imaging techniques and histopathology. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, , v. 105, n. 3, p. 358-364, Mar. 2008.

BEDOJNI, A. et al. Learning from experience. Proposal of a refined definition and staging system for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): Secondary Learning from experience. Proposal of a refined definition and staging system for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). **Oral Dis**, , v. 18, n. 6, p. 621-623, Sep. 2012.

BEDOJNI, A. et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis can hide jaw metastases: Secondary Bisphosphonate-associated osteonecrosis can hide jaw metastases. **Bone**, , v. 41, n. 6, p. 942-945, Dec. 2007.

BENTLEY, M. D. et al. The use of microcomputed tomography to study microvasculature in small rodents: Secondary The use of microcomputed tomography to study microvasculature in small rodents. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, , v. 282, n. 5, p. R1267-1279, May. 2002.

BERENSON, J. R. et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guidelines: the role of bisphosphonates in multiple myeloma: Secondary American Society of Clinical Oncology clinical practice guidelines: the role of bisphosphonates in multiple myeloma. **J Clin Oncol**, , v. 20, n. 17, p. 3719-3736, Sep 1. 2002.

BERTE, R. et al. Jaw avascular bone necrosis associated with long-term use of bisphosphonates: Secondary Jaw avascular bone necrosis associated with long-term use of bisphosphonates. **Tumori**, , v. 92, n. 4, p. 361, Jul-Aug. 2006.

BI, Y. et al. Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice: Secondary Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. **Am J Pathol**, , v. 177, n. 1, p. 280-290, Jul. 2010.

BIANCHI, S. D. et al. Computerized tomographic findings in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw in patients with cancer: Secondary Computerized tomographic findings in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw in patients with cancer. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, , v. 104, n. 2, p. 249-258, Aug. 2007.

BISDAS, S. et al. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: CT and MRI spectrum of findings in 32 patients: Secondary Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: CT and MRI spectrum of findings in 32 patients. **Clin Radiol**, , v. 63, n. 1, p. 71-77, Jan. 2008.

BODY, J. J. Clinical research update: zoledronate: Secondary Clinical research update: zoledronate. **Cancer**, , v. 80, n. 8 Suppl, p. 1699-1701, Oct 15. 1997.

BONNET, N. et al. Assessment of trabecular bone microarchitecture by two different x-ray microcomputed tomographs: a comparative study of the rat distal tibia using Skyscan and Scanco devices: Secondary Assessment of trabecular bone microarchitecture by two different x-ray microcomputed tomographs: a comparative study of the rat distal tibia using Skyscan and Scanco devices. **Med Phys**, , v. 36, n. 4, p. 1286-1297, Apr. 2009.

BOUXSEIN, M. L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography: Secondary Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **J Bone Miner Res**, , v. 25, n. 7, p. 1468-1486, Jul. 2010.

BROOKS, J. K. et al. Osteonecrosis of the jaws associated with use of risedronate: report of 2 new cases: Secondary Osteonecrosis of the jaws associated with use of risedronate: report of 2 new cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, , v. 103, n. 6, p. 780-786, Jun. 2007.

CARTER, G. et al. Bisphosphonates and avascular necrosis of the jaw: a possible association: Secondary Bisphosphonates and avascular necrosis of the jaw: a possible association. **Med J Aust**, , v. 182, n. 8, p. 413-415, Apr 18. 2005.

CAVALCANTI, M. (2010). **Tomografia computadorizada por feixe cônico: Secondary Tomografia computadorizada por feixe cônico**. first. Santos: Santos, 2010. 228

CHAPPARD, D. et al. Comparison insight bone measurements by histomorphometry and microCT: Secondary Comparison insight bone measurements by histomorphometry and microCT. **J Bone Miner Res**, , v. 20, n. 7, p. 1177-1184, Jul. 2005.

CHIANDUSSI, S. et al. Clinical and diagnostic imaging of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws: Secondary Clinical and diagnostic imaging of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. **Dentomaxillofac Radiol**, , v. 35, n. 4, p. 236-243, Jul. 2006.

COLLIN, P. et al. Constitutive expression of osteoclast-stimulating activity by normal clonal osteoblast-like cells: effects of parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D3: Secondary Constitutive expression of osteoclast-stimulating activity by normal clonal osteoblast-like cells: effects of parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Endocrinology**, , v. 131, n. 3, p. 1181-1187, Sep. 1992.

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

DEPYPERE, M. **MicroCT imaging of bone architecture and vasculature:** Secondary title. 2013. Pages. Arenberg Doctoral School - Faculty of Engineering - KU Leuven, Leuven.

DUNN, P. M. Wilhelm Conrad Roentgen (1845-1923), the discovery of x rays and perinatal diagnosis: Secondary Wilhelm Conrad Roentgen (1845-1923), the discovery of x rays and perinatal diagnosis. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, , v. 84, n. 2, p. F138-139, Mar. 2001.

EBETINO, F. H. et al. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates: Secondary The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. **Bone**, , v. 49, n. 1, p. 20-33, Jul. 2011.

FANUSCU, M. I.; CHANG, T. L. Three-dimensional morphometric analysis of human cadaver bone: microstructural data from maxilla and mandible: Secondary Three-dimensional morphometric analysis of human cadaver bone: microstructural data from maxilla and mandible. **Clin Oral Implants Res**, , v. 15, n. 2, p. 213-218, Apr. 2004.

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

FILLEUL, O. et al. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a review of 2,400 patient cases: Secondary Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a review of 2,400 patient cases. **Journal of cancer research and clinical oncology**, , v. 136, n. 8, p. 1117-1124, Aug. 2010.

FLEISCH, H. Diphosphonates: history and mechanisms of action: Secondary Diphosphonates: history and mechanisms of action. **Metab Bone Dis Relat Res**, , v. 3, n. 4-5, p. 279-287, 1981.

FLEISCH, H. Bisphosphonates: a new class of drugs in diseases of bone and calcium metabolism: Secondary Bisphosphonates: a new class of drugs in diseases of bone and calcium metabolism. **Recent Results Cancer Res**, , v. 116, n. 1-28, 1989.

FLEISCH, H. New bisphosphonates in osteoporosis: Secondary New bisphosphonates in osteoporosis. **Osteoporos Int**, , v. 3 Suppl 2, n. S15-22, 1993.

FLEISCH, H. Bisphosphonates: mechanisms of action: Secondary Bisphosphonates: mechanisms of action. **Endocr Rev**, , v. 19, n. 1, p. 80-100, Feb. 1998.

FLEISCH, H. Development of bisphosphonates: Secondary Development of bisphosphonates. **Breast Cancer Res**, , v. 4, n. 1, p. 30-34, 2002.

FLEISCH, H. A. Bisphosphonates: preclinical aspects and use in osteoporosis: Secondary Bisphosphonates: preclinical aspects and use in osteoporosis. **Annals of medicine**, , v. 29, n. 1, p. 55-62, Feb. 1997.

FLEISCH, H. M., J. RUSSEL RG. Effect of pyrophosphate on dissolution of hydroxyapatite and its possible importance in calcium homostasis: Secondary Effect of pyrophosphate on dissolution of hydroxyapatite and its possible importance in calcium homostasis. **1966**, , v. 122, n. 2, p. 317-320, 1966.

FLEISCH, H. N. W. Mechanisms of calcification: role of collagen, polyphosphates, and phosphatase: Secondary Mechanisms of calcification: role of collagen, polyphosphates, and phosphatase. **Am J Physiol**, , v. 200, n. 1296-1300, 1961.

FLEISCH, H. R., RG. STRAUMANN F. Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implication in calcium homeostasis: Secondary Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implication in calcium homeostasis. **Nature**, , v. 212, n. 5065, p. 901-903, 1966.

FOURNIER, P. et al. Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats: Secondary Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular

regrowth in the ventral prostate in castrated rats. **Cancer Res**, , v. 62, n. 22, p. 6538-6544, Nov 15. 2002.

FRANCIS, M. D. et al. Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo: Secondary Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. **Science**, , v. 165, n. 3899, p. 1264-1266, Sep 19. 1969.

GONZALEZ-GARCIA, R.; MONJE, F. Is micro-computed tomography reliable to determine the microstructure of the maxillary alveolar bone?: Secondary Is micro-computed tomography reliable to determine the microstructure of the maxillary alveolar bone? **Clin Oral Implants Res**, , v. 24, n. 7, p. 730-737, Jul. 2013.

GRAHAM, J. W. Bisphosphonates and orthodontics: Clinical implications: Secondary Bisphosphonates and orthodontics: Clinical implications. **J Clin Orthod**, , v. 40, n. 7, p. 425-428; quiz 419, Jul. 2006.

GUGGENBERGER, R. et al. Cone beam computed tomography for diagnosis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: evaluation of quantitative and qualitative image parameters: Secondary Cone beam computed tomography for diagnosis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: evaluation of quantitative and qualitative image parameters. **Skeletal Radiol**, , v. 43, n. 12, p. 1669-1678, Dec. 2014.

GULDBERG, R. E. et al. Analyzing bone, blood vessels, and biomaterials with microcomputed tomography: Secondary Analyzing bone, blood vessels, and biomaterials with microcomputed tomography. **IEEE Eng Med Biol Mag**, , v. 22, n. 5, p. 77-83, Sep-Oct. 2003.

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

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

HESSE, B. et al. Alterations of mass density and 3D osteocyte lacunar properties in bisphosphonate-related osteonecrotic human jaw bone, a synchrotron microCT study: Secondary Alterations of mass density and 3D osteocyte lacunar properties in

bisphosphonate-related osteonecrotic human jaw bone, a synchrotron microCT study. **PLoS One**, , v. 9, n. 2, p. e88481, 2014.

HILLNER, B. E. et al. American Society of Clinical Oncology guideline on the role of bisphosphonates in breast cancer. American Society of Clinical Oncology Bisphosphonates Expert Panel: Secondary American Society of Clinical Oncology guideline on the role of bisphosphonates in breast cancer. American Society of Clinical Oncology Bisphosphonates Expert Panel. **J Clin Oncol**, , v. 18, n. 6, p. 1378-1391, Mar. 2000.

HIRSHBERG, A. et al. Metastatic tumors to the jawbones: analysis of 390 cases: Secondary Metastatic tumors to the jawbones: analysis of 390 cases. **J Oral Pathol Med**, , v. 23, n. 8, p. 337-341, Sep. 1994.

HOKUGO, A. et al. Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with vitamin D deficiency in rats: Secondary Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with vitamin D deficiency in rats. **J Bone Miner Res**, , v. 25, n. 6, p. 1337-1349, Jun. 2010.

HONOS, G. et al. Contrast echocardiography in Canada: Canadian Cardiovascular Society/Canadian Society of Echocardiography position paper: Secondary Contrast echocardiography in Canada: Canadian Cardiovascular Society/Canadian Society of Echocardiography position paper. **Can J Cardiol**, , v. 23, n. 5, p. 351-356, Apr. 2007.

HOUNSFIELD, G. N. Computerized transverse axial scanning (tomography). 1. Description of system: Secondary Computerized transverse axial scanning (tomography). 1. Description of system. **Br J Radiol**, , v. 46, n. 552, p. 1016-1022, 1973.

HUANG, R. C. et al. Alendronate inhibits spine fusion in a rat model: Secondary Alendronate inhibits spine fusion in a rat model. **Spine (Phila Pa 1976)**, , v. 30, n. 22, p. 2516-2522, Nov 15. 2005.

HUGHES, D. E. et al. Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in long-term cultures of human bone marrow: Secondary Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in long-term cultures of human bone marrow. **J Clin Invest**, , v. 83, n. 6, p. 1930-1935, Jun. 1989.

HUGHES, D. E. et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo: Secondary Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. **J Bone Miner Res**, , v. 10, n. 10, p. 1478-1487, Oct. 1995.

IGARASHI, K. et al. Anchorage and retentive effects of a bisphosphonate (AHBuBP) on tooth movements in rats: Secondary Anchorage and retentive effects of a bisphosphonate (AHBuBP) on tooth movements in rats. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, , v. 106, n. 3, p. 279-289, Sep. 1994.

IMADA, T. S. N. **Estudo do Canal Incisivo por meio da Tomografia Volumétrica**: Secondary title. 2011. Pages. Odontologia. Área de Concentração: Estomatologia - Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo, Bauru.

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

KAPADIA, R. D. et al. Applications of micro-CT and MR microscopy to study pre-clinical models of osteoporosis and osteoarthritis: Secondary Applications of micro-CT and MR microscopy to study pre-clinical models of osteoporosis and osteoarthritis. **Technol Health Care**, , v. 6, n. 5-6, p. 361-372, Dec. 1998.

KAPITOLA, J. et al. Effect of growth hormone and pamidronate on bone blood flow, bone mineral and IGF-I levels in the rat: Secondary Effect of growth hormone and pamidronate on bone blood flow, bone mineral and IGF-I levels in the rat. **Physiol Res**, , v. 49 Suppl 1, n. S101-106, 2000.

KHAN, S. A. et al. Elimination and biochemical responses to intravenous alendronate in postmenopausal osteoporosis: Secondary Elimination and biochemical responses to intravenous alendronate in postmenopausal osteoporosis. **J Bone Miner Res**, , v. 12, n. 10, p. 1700-1707, Oct. 1997.

KIKUIRI, T. et al. Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice: Secondary Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. **J Bone Miner Res**, , v. 25, n. 7, p. 1668-1679, Jul. 2010.

KOBAYASHI, Y. et al. Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice: Secondary Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice. **Journal of bone and mineral metabolism**, , v. 28, n. 2, p. 165-175, Mar. 2010.

KRISHNAN, A. et al. Imaging findings of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with emphasis on early magnetic resonance imaging findings: Secondary Imaging findings of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with emphasis on early magnetic resonance imaging findings. **J Comput Assist Tomogr**, , v. 33, n. 2, p. 298-304, Mar-Apr. 2009.

KUHN, J. L. et al. Evaluation of a microcomputed tomography system to study trabecular bone structure: Secondary Evaluation of a microcomputed tomography system to study trabecular bone structure. **J Orthop Res**, , v. 8, n. 6, p. 833-842, Nov. 1990.

LASCALA, C. A. et al. Analysis of the accuracy of linear measurements obtained by cone beam computed tomography (CBCT-NewTom): Secondary Analysis of the accuracy of linear measurements obtained by cone beam computed tomography (CBCT-NewTom). **Dentomaxillofac Radiol**, , v. 33, n. 5, p. 291-294, Sep. 2004.

LEHMAN, R. A., JR. et al. The effect of alendronate sodium on spinal fusion: a rabbit model: Secondary The effect of alendronate sodium on spinal fusion: a rabbit model. **Spine J**, , v. 4, n. 1, p. 36-43, Jan-Feb. 2004.

LEVIN, L. et al. Effect of topical alendronate on root resorption of dried replanted dog teeth: Secondary Effect of topical alendronate on root resorption of dried replanted dog teeth. **Dent Traumatol**, , v. 17, n. 3, p. 120-126, Jun. 2001.

LICATA, A. A. Bisphosphonate therapy: Secondary Bisphosphonate therapy. **Am J Med Sci**, , v. 313, n. 1, p. 17-22, Jan. 1997.

LIN, J. H. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties: Secondary Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. **Bone**, , v. 18, n. 2, p. 75-85, Feb. 1996.

LIN, J. H. et al. Physiological disposition of alendronate, a potent anti-osteolytic bisphosphonate, in laboratory animals: Secondary Physiological disposition of alendronate, a potent anti-osteolytic bisphosphonate, in laboratory animals. **Drug Metab Dispos**, , v. 19, n. 5, p. 926-932, Sep-Oct. 1991.

LOPEZ-JORNET, P. et al. An experimental study of bisphosphonate-induced jaws osteonecrosis in Sprague-Dawley rats: Secondary An experimental study of bisphosphonate-induced jaws osteonecrosis in Sprague-Dawley rats. **J Oral Pathol Med**, , v. 39, n. 9, p. 697-702, Oct. 2010.

LOUBELE, M. et al. Image quality vs radiation dose of four cone beam computed tomography scanners: Secondary Image quality vs radiation dose of four cone beam

computed tomography scanners. **Dento maxillo facial radiology**, , v. 37, n. 6, p. 309-318, Sep. 2008.

LUDLOW, J. B. Regarding "Influence of CBCT exposure conditions on radiation dose": Secondary Regarding "Influence of CBCT exposure conditions on radiation dose". **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, , v. 106, n. 5, p. 627-628; author reply 628-629, Nov. 2008.

LUDLOW, J. B. et al. Dosimetry of two extraoral direct digital imaging devices: NewTom cone beam CT and Orthophos Plus DS panoramic unit: Secondary Dosimetry of two extraoral direct digital imaging devices: NewTom cone beam CT and Orthophos Plus DS panoramic unit. **Dentomaxillofac Radiol**, , v. 32, n. 4, p. 229-234, Jul. 2003.

LUDLOW, J. B. et al. Dosimetry of 3 CBCT devices for oral and maxillofacial radiology: CB Mercuray, NewTom 3G and i-CAT: Secondary Dosimetry of 3 CBCT devices for oral and maxillofacial radiology: CB Mercuray, NewTom 3G and i-CAT. **Dentomaxillofac Radiol**, , v. 35, n. 4, p. 219-226, Jul. 2006.

LUDLOW, J. B.; IVANOVIC, M. Comparative dosimetry of dental CBCT devices and 64-slice CT for oral and maxillofacial radiology: Secondary Comparative dosimetry of dental CBCT devices and 64-slice CT for oral and maxillofacial radiology. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, , v. 106, n. 1, p. 106-114, Jul. 2008.

MAAHS, M. N., VP. AZAMBUJA, AA. CHERUBINI, K. Bisphosphonates and jaw osteonecrosis: Secondary Bisphosphonates and jaw osteonecrosis. **Rev. odonto ciênc**, , v. 24, n. 4, p. 337-344, 2009.

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

MARX, R. E. Osteoradionecrosis: a new concept of its pathophysiology: Secondary Osteoradionecrosis: a new concept of its pathophysiology. **J Oral Maxillofac Surg**, , v. 41, n. 5, p. 283-288, May. 1983.

MARX, R. E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic: Secondary Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, , v. 61, n. 9, p. 1115-1117, Sep. 2003.

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

MAVROKOKKI, T. et al. Nature and frequency of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in Australia: Secondary Nature and frequency of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in Australia. **J Oral Maxillofac Surg**, , v. 65, n. 3, p. 415-423, Mar. 2007.

MCCLUNG, M. R. et al. Opposite bone remodeling effects of teriparatide and alendronate in increasing bone mass: Secondary Opposite bone remodeling effects of teriparatide and alendronate in increasing bone mass. **Arch Intern Med**, , v. 165, n. 15, p. 1762-1768, Aug 8-22. 2005.

MCMAHON, R. E. et al. Osteonecrosis: a multifactorial etiology: Secondary Osteonecrosis: a multifactorial etiology. **J Oral Maxillofac Surg**, , v. 62, n. 7, p. 904-905, Jul. 2004.

MIGLIORATI, C. A. Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis: Secondary Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis. **J Clin Oncol**, , v. 21, n. 22, p. 4253-4254, Nov 15. 2003.

MIGLIORATI, C. A. et al. Managing the care of patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis: an American Academy of Oral Medicine position paper: Secondary Managing the care of patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis: an American Academy of Oral Medicine position paper. **J Am Dent Assoc**, , v. 136, n. 12, p. 1658-1668, Dec. 2005a.

MIGLIORATI, C. A. et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of mandibular and maxillary bone: an emerging oral complication of supportive cancer therapy: Secondary Bisphosphonate-associated osteonecrosis of mandibular and maxillary bone: an emerging oral complication of supportive cancer therapy. **Cancer**, , v. 104, n. 1, p. 83-93, Jul 1. 2005b.

MIRACLE, A. C.; MUKHERJI, S. K. Conebeam CT of the head and neck, part 2: clinical applications: Secondary Conebeam CT of the head and neck, part 2: clinical applications. **AJNR Am J Neuroradiol**, , v. 30, n. 7, p. 1285-1292, Aug. 2009.

MIRZAI, R. et al. The pathogenesis of osteonecrosis and the relationships to corticosteroids: Secondary The pathogenesis of osteonecrosis and the relationships to corticosteroids. **J Asthma**, , v. 36, n. 1, p. 77-95, 1999.

MOEINI, M. et al. Radiography finding in the jaws in children taking bisphosphonate: Secondary Radiography finding in the jaws in children taking bisphosphonate. **Iran J Ped Hematol Oncol**, , v. 3, n. 3, p. 114-118, 2013.

MORAG, Y. et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a pictorial review: Secondary Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a pictorial review. **Radiographics**, , v. 29, n. 7, p. 1971-1984, Nov. 2009.

MORTENSEN, M. et al. Osteonecrosis of the jaw associated with bisphosphonate use: Presentation of seven cases and literature review: Secondary Osteonecrosis of the jaw associated with bisphosphonate use: Presentation of seven cases and literature review. **Laryngoscope**, , v. 117, n. 1, p. 30-34, Jan. 2007.

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

MURAKAMI, H. et al. A possible mechanism of the specific action of bisphosphonates on osteoclasts: tiludronate preferentially affects polarized osteoclasts having ruffled borders: Secondary A possible mechanism of the specific action of bisphosphonates on osteoclasts: tiludronate preferentially affects polarized osteoclasts having ruffled borders. **Bone**, , v. 17, n. 2, p. 137-144, Aug. 1995.

NACKAERTS, O. et al. Segmentation of Trabecular Jaw Bone on Cone Beam CT Datasets: Secondary Segmentation of Trabecular Jaw Bone on Cone Beam CT Datasets. **Clin Implant Dent Relat Res**, , v. n. Mar 14. 2014.

NASE, J. B.;SUZUKI, J. B. Osteonecrosis of the jaw and oral bisphosphonate treatment: Secondary Osteonecrosis of the jaw and oral bisphosphonate treatment. **J Am Dent Assoc**, , v. 137, n. 8, p. 1115-1119; quiz 1169-1170, Aug. 2006.

NAZARIAN, A. et al. Quantitative micro-computed tomography: a non-invasive method to assess equivalent bone mineral density: Secondary Quantitative micro-computed tomography: a non-invasive method to assess equivalent bone mineral density. **Bone**, , v. 43, n. 2, p. 302-311, Aug. 2008.

NOVINCE, C. M. et al. Osteonecrosis of the jaw: an update and review of recommendations: Secondary Osteonecrosis of the jaw: an update and review of recommendations. **Cells, tissues, organs**, , v. 189, n. 1-4, p. 275-283, 2009.

OLUTAYO, J. et al. Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw Bone: Radiological Pattern and the Potential Role of CBCT in Early Diagnosis: Secondary

Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw Bone: Radiological Pattern and the Potential Role of CBCT in Early Diagnosis. **J Oral Maxillofac Res**, , v. 1, n. 2, p. e3, 2010.

OTTEWELL, P. D. et al. Antitumor effects of doxorubicin followed by zoledronic acid in a mouse model of breast cancer: Secondary Antitumor effects of doxorubicin followed by zoledronic acid in a mouse model of breast cancer. **J Natl Cancer Inst**, , v. 100, n. 16, p. 1167-1178, Aug 20. 2008.

PHAL, P. M. et al. Imaging findings of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws: Secondary Imaging findings of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. **AJNR Am J Neuroradiol**, , v. 28, n. 6, p. 1139-1145, Jun-Jul. 2007.

PURCELL, P. M.; BOYD, I. W. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: Secondary Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. **Med J Aust**, , v. 182, n. 8, p. 417-418, Apr 18. 2005.

REID, I. R. et al. Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity?: Secondary Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? **Bone**, , v. 41, n. 3, p. 318-320, Sep. 2007.

REVELL, P. A. Histomorphometry of bone: Secondary Histomorphometry of bone. **J Clin Pathol**, , v. 36, n. 12, p. 1323-1331, Dec. 1983.

RODAN, G. A.; FLEISCH, H. A. Bisphosphonates: mechanisms of action: Secondary Bisphosphonates: mechanisms of action. **J Clin Invest**, , v. 97, n. 12, p. 2692-2696, Jun 15. 1996.

ROGERS, M. J. et al. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates: Secondary Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Bone**, , v. 49, n. 1, p. 34-41, Jul. 2011.

ROGERS, M. J. et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates: Secondary Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Cancer**, , v. 88, n. 12 Suppl, p. 2961-2978, Jun 15. 2000.

RUGGIERO, S. L. et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw - 2009 update: Secondary 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, p. 119-130, Dec. 2009.

RUGGIERO, S. L. et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management: Secondary Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, , v. 102, n. 4, p. 433-441, Oct. 2006.

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

RUSSELL, R. G. Bisphosphonates: from bench to bedside: Secondary Bisphosphonates: from bench to bedside. **Ann N Y Acad Sci**, , v. 1068, n. 367-401, Apr. 2006.

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

RUSSELL, R. G. et al. The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action: Secondary The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action. **J Bone Miner Res**, , v. 14 Suppl 2, n. 53-65, Oct. 1999.

RUSSELL, R. G. et al. Bisphosphonates: an update on mechanisms of action and how these relate to clinical efficacy: Secondary Bisphosphonates: an update on mechanisms of action and how these relate to clinical efficacy. **Ann N Y Acad Sci**, , v. 1117, n. 209-257, Nov. 2007.

SCARFE, W. C.; FARMAN, A. G. What is cone-beam CT and how does it work?: Secondary What is cone-beam CT and how does it work? **Dental clinics of North America**, , v. 52, n. 4, p. 707-730, v. Oct. 2008.

SCARFE, W. C. et al. Clinical applications of cone-beam computed tomography in dental practice: Secondary Clinical applications of cone-beam computed tomography in dental practice. **J Can Dent Assoc**, , v. 72, n. 1, p. 75-80, Feb. 2006.

SCHENK, R. et al. Quantitative morphometric evaluation of the inhibitory activity of new aminobisphosphonates on bone resorption in the rat: Secondary Quantitative morphometric evaluation of the inhibitory activity of new aminobisphosphonates on bone resorption in the rat. **Calcif Tissue Int**, , v. 38, n. 6, p. 342-349, Jun. 1986.

SCHEPER, M. A. et al. Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis: Secondary Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential

mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. **British journal of haematology**, , v. 144, n. 5, p. 667-676, Mar. 2009.

SENEL, F. C. et al. Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate: Secondary Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, , v. 109, n. 3, p. 385-391, Mar. 2010.

SONIS, S. T. et al. Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients: Secondary Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. **Oral Oncol**, , v. 45, n. 2, p. 164-172, Feb. 2009.

SPRECHER, S. et al. Magnetic resonance imaging presentation of lytic Paget's disease of the cervical spine: Secondary Magnetic resonance imaging presentation of lytic Paget's disease of the cervical spine. **J Bone Miner Res**, , v. 17, n. 11, p. 1929-1930, Nov. 2002.

SUZUKI, K. et al. Current topics in pharmacological research on bone metabolism: inhibitory effects of bisphosphonates on the differentiation and activity of osteoclasts: Secondary Current topics in pharmacological research on bone metabolism: inhibitory effects of bisphosphonates on the differentiation and activity of osteoclasts. **J Pharmacol Sci**, , v. 100, n. 3, p. 189-194, Mar. 2006.

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

Title: secondary title. Edition. : Publisher, year. Number of pages. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: Secondary American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. **J Oral Maxillofac Surg**, , v. 65, n. 3, p. 369-376, Mar. 2007.

TSIKLAKIS, K. et al. Dose reduction in maxillofacial imaging using low dose Cone Beam CT: Secondary Dose reduction in maxillofacial imaging using low dose Cone Beam CT. **Eur J Radiol**, , v. 56, n. 3, p. 413-417, Dec. 2005.

VAN DEN WYNGAERT, T. et al. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: cause and effect or a post hoc fallacy?: Secondary Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: cause and effect or a post hoc fallacy? **Ann Oncol**, , v. 17, n. 8, p. 1197-1204, Aug. 2006.

VASIKARAN, S. D. Bisphosphonates: an overview with special reference to alendronate: Secondary Bisphosphonates: an overview with special reference to alendronate. **Ann Clin Biochem**, , v. 38, n. Pt 6, p. 608-623, Nov. 2001.

VIERECK, V. et al. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts: Secondary Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. **Biochem Biophys Res Commun**, , v. 291, n. 3, p. 680-686, Mar 1. 2002.

VITTE, C. et al. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption: Secondary Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. **Endocrinology**, , v. 137, n. 6, p. 2324-2333, Jun. 1996.

WAARSING, J. H. et al. Detecting and tracking local changes in the tibiae of individual rats: a novel method to analyse longitudinal in vivo micro-CT data: Secondary Detecting and tracking local changes in the tibiae of individual rats: a novel method to analyse longitudinal in vivo micro-CT data. **Bone**, , v. 34, n. 1, p. 163-169, Jan. 2004a.

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

WALTER, C. et al. Incidence of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in breast cancer patients: Secondary Incidence of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in breast cancer patients. **Cancer**, , v. 115, n. 8, p. 1631-1637, Apr 15. 2009.

WALTER, C. et al. Prevalence of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaws in multiple myeloma patients: Secondary Prevalence of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaws in multiple myeloma patients. **Head & face medicine**, , v. 6, n. 11, 2010.

WALTER, C. et al. Prevalence of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw within the field of osteonecrosis: Secondary Prevalence of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw within the field of osteonecrosis. **Support Care Cancer**, , v. 15, n. 2, p. 197-202, Feb. 2007.

WHAITES, E. (2003). **Princípios de Radiologia Odontológica**: Secondary Princípios de Radiologia Odontológica. São Paulo: Ed Artmed, 2003. 444

WIDLER, L. et al. Highly potent geminal bisphosphonates. From pamidronate disodium (Aredia) to zoledronic acid (Zometa): Secondary Highly potent geminal bisphosphonates. From pamidronate disodium (Aredia) to zoledronic acid (Zometa). **J Med Chem**, , v. 45, n. 17, p. 3721-3738, Aug 15. 2002.

WILDE, F. et al. Prevalence of cone beam computed tomography imaging findings according to the clinical stage of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: Secondary Prevalence of cone beam computed tomography imaging findings according to the clinical stage of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, , v. 114, n. 6, p. 804-811, Dec. 2012.

WILKINSON, G. S. et al. Intravenous bisphosphonate therapy and inflammatory conditions or surgery of the jaw: a population-based analysis: Secondary Intravenous bisphosphonate therapy and inflammatory conditions or surgery of the jaw: a population-based analysis. **J Natl Cancer Inst**, , v. 99, n. 13, p. 1016-1024, Jul 4. 2007.

WOO, S. B. et al. Narrative [corrected] review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws: Secondary Narrative [corrected] review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. **Annals of internal medicine**, , v. 144, n. 10, p. 753-761, May 16. 2006.

WOOD, J. et al. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid: Secondary Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. **J Pharmacol Exp Ther**, , v. 302, n. 3, p. 1055-1061, Sep. 2002.

WU, Y. et al. Compositional and material properties of rat bone after bisphosphonate and/or Strontium ranelate drug treatment: Secondary Compositional and material properties of rat bone after bisphosphonate and/or Strontium ranelate drug treatment. **J Pharm Pharm Sci**, , v. 16, n. 1, p. 52-64, 2013.

YAMASHITA, J. et al. Effect of zoledronate on oral wound healing in rats: Secondary Effect of zoledronate on oral wound healing in rats. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 6, p. 1405-1414, Mar 15. 2011.

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**. Secondary title. 2014. Pages. Departamento de Estomatologia - Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru-SP.

ANEXOS

ANEXO A - Aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 003/2013

Bauru, 18 de abril de 2013.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Análise molecular e por MicroCT do efeito do ácido zoledrônico nos maxilares de ratos**, de autoria de Thaís Sumie Nozu Imada, sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação e considerado **APROVADO** em reunião desta Comissão realizada no dia **15 de abril de 2013**.

Solicitamos que qualquer alteração na pesquisa seja comunicada a esta Comissão, e que ao final seja enviado um Relatório com os resultados obtidos, para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Izabel Regina Fisher Rubira-Bullen
Docente do Departamento de Estomatologia

ANEXO 2 - Valores de suavização e micro desalinhamento para ajuste fino na reconstrução dos volumes

RATO	Suavização	Micro desalinhamento
RATO 1 CO	4	-7
RATO 2 CO	3	-9
RATO 3 CO	3	-8,5
RATO 4 CO	5	-9
RATO 5 CO	5	-6
RATO 6 CO	5	-9,5
RATO 7 CO	5	-7
RATO 8 CO	5	-6,5
RATO 9 CO	8	-9
RATO 10 CO	7	-7,5
RATO 11 CO	8	-7
RATO 12 CO	8	-7,5
RATO 1 AZ	8	-9
RATO 2 AZ	7	-7,5
RATO 3 AZ	7	-7
RATO 4 AZ	7	-10,5
RATO 5 AZ	7	-8,5
RATO 6 AZ	8	-7
RATO 7 AZ	6	-10,5
RATO 8 AZ	7	-6,5
RATO 9 AZ	7	-7
RATO 10 AZ	7	-7
RATO 11 AZ	7	-8,5
RATO 12 AZ	8	-9
Média	6,3	-8,0

ANEXO 3 - Valores do threshold do GCO

Rato	Min	Max
1 CO	70	157
2 CO	56	144
3 CO	56	148
4 CO	77	164
5 CO	73	165
6 CO	69	160
7 CO	67	158
8 CO	74	158
9 CO	57	110
10 CO	68	165
11 CO	63	160
12 CO	85	156
Média CO	67,9	153,8

ANEXO 4 - Valores do threshold do GAZ

Rato	Min	Max
1 AZ	80	166
2 AZ	72	156
2 AZ	70	152
4 AZ	69	157
5 AZ	75	160
6 AZ	68	153
7 AZ	74	151
8 AZ	72	157
9 AZ	78	159
10 AZ	64	144
11 AZ	64	147
12 AZ	72	169
Média AZ	71,5	155,9

ANEXO 5 - Resultados da análise de μ CT do GCO

Parâmetros	Unidade	Rato 1 CO	Rato 2 CO	Rato 3 CO	Rato 4 CO	Rato 5 CO	Rato 6 CO	Rato 7 CO	Rato 8 CO	Rato 9 CO	Rato 10 CO	Rato 11 CO	Rato 12 CO
TV	pixel ³	990006,4	990006,4	990006,4	990006,4	990006,4	990006,4	990006,4	990006,4	990006,4	990006,4	990006,4	990006,4
BV	pixel ³	404695	377630,2	380697,1	470297,9	487993,3	630789,1	358345,7	392654,4	358704,5	450133,5	411849,5	311025,3
BV/TV	%	40,88	38,14	38,45	47,50	49,29	63,71	36,20	39,66	36,23	45,47	41,60	31,42
BS/BV	1/pixel	0,50	0,53	0,53	0,40	0,40	0,36	0,49	0,54	0,45	0,45	0,42	0,50
Tb.Pf	1/pixel	0,15	0,16	0,16	0,13	0,13	0,10	0,20	0,15	0,18	0,15	0,15	0,21
SMI		1,96	2,06	2,05	2,14	2,11	1,99	2,46	1,85	2,46	2,09	2,07	2,43
Tb.Th	pixel	8,64	8,30	8,36	11,19	11,39	13,05	9,56	7,86	10,51	10,07	11,18	10,07
Tb.N	1/pixel	0,047	0,046	0,046	0,042	0,043	0,049	0,038	0,050	0,034	0,045	0,037	0,031
Tb.Sp	pixel	15,80	17,45	17,65	17,12	17,06	15,37	17,42	17,69	17,59	17,16	17,20	18,80
Po(tot)	%	59,13	61,87	61,55	52,50	50,71	36,28	63,80	60,34	63,77	54,53	58,401	68,58
Conn.Dn	1/pixel ³	0,0004	0,0005	0,0005	0,0003	0,0004	0,0004	0,0005	0,0005	0,0003	0,0004	0,0003	0,0004

ANEXO 6 - Resultados da análise de μ CT do GAZ

Parâmetros	Unidade	Rato 1 AZ	Rato 2 AZ	Rato 3 AZ	Rato 4 AZ	Rato 5 AZ	Rato 6 AZ	Rato 7 AZ	Rato 8 AZ	Rato 9 AZ	Rato 10 AZ	Rato 11 AZ	Rato 12 AZ
TV	pixel ³	990006,4	990006,4	990006,4	990006,4	990006,4	990006,4	990006,4	990006,4	990006,4	990006,4	990006,4	990006,4
BV	pixel ³	615987,4	501518,6	479051,6	646736,3	654563,5	598972,1	757405,1	747279,2	543237,8	563966,4	491615,1	819177,5
BV/TV	%	62,22	50,66	48,39	65,33	66,12	60,50	76,51	75,48	54,87	56,97	49,66	82,74
BS/BV	1/pixel	0,32	0,36	0,41	0,33	0,33	0,34	0,29	0,27	0,34	0,37	0,38	0,26
Tb.Pf	1/pixel	0,12	0,14	0,12	0,11	0,08	0,11	0,06	0,08	0,11	0,10	0,13	0,06
SMI		2,23	2,24	1,87	2,06	1,71	2,00	1,39	1,73	2,03	1,75	2,06	1,68
Tb.Th	pixel	15,61	13,53	10,73	14,59	14,17	14,25	15,16	17,60	14,50	12,23	12,05	17,82
Tb.N	1/pixel	0,040	0,037	0,045	0,045	0,047	0,042	0,051	0,043	0,038	0,047	0,041	0,046
Tb.Sp	pixel	15,61	18,03	16,45	16,112	16,29	16,48	13,71	14,6	16,36	16,35	17,21	12,53
Po(tot)	%	37,78	49,34	51,61	34,67	33,88	39,50	23,49	24,52	45,13	43,03	50,34	17,25
Conn.Dn	1/pixel ³	0,0003	0,0003	0,0004	0,0004	0,0003	0,0003	0,0002	0,0002	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003