

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS

Gabriel Bassan Marinho Maciel

**AVALIAÇÃO DO CÁLCIO, FÓSFORO, PARATORMÔNIO E  
FOSFATASE ALCALINA SÉRICOS EM RATOS SOB EFEITO DE  
MEDICAMENTOS ANTIRREABSORTIVOS E EXODONTIA**

Santa Maria, RS  
2021

**Gabriel Bassan Marinho Maciel**

**AVALIAÇÃO DO CÁLCIO, FÓSFORO, PARATORMÔNIO E FOSFATASE  
ALCALINA SÉRICOS EM RATOS SOB EFEITO DE MEDICAMENTOS  
ANTIRREABSORTIVOS E EXODONTIA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, área de concentração em Odontologia, ênfase em Patologia Bucal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Odontológicas**.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Cademartori Danesi

Santa Maria, RS  
2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Maciel, Gabriel Bassan Marinho  
AVALIAÇÃO DO CÁLCIO, FÓSFORO, PARATORMÔNIO E FOSFATASE  
ALCALINA SÉRICOS EM RATOS SOB EFEITO DE MEDICAMENTOS  
ANTIRREABSORTIVOS E EXODONTIA / Gabriel Bassan Marinho  
Maciel.- 2021.  
122 p.; 30 cm

Orientadora: Cristiane Cademartori Danesi  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Ciências Odontológicas, RS, 2021

1. Osteonecrose 2. Ratos 3. Alendronato 4. Ácido  
Zoledrônico 5. Denosumab I. Danesi, Cristiane Cademartori  
II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, GABRIEL BASSAN MARINHO MACIEL, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

**Gabriel Bassan Marinho Maciel**

**AVALIAÇÃO DO CÁLCIO, FÓSFORO, PARATORMÔNIO E FOSFATASE  
ALCALINA SÉRICOS EM RATOS SOB EFEITO DE MEDICAMENTOS  
ANTIRREABSORTIVOS E EXODONTIA**

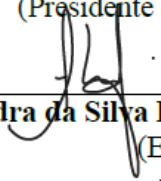
Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, área de concentração em Odontologia, ênfase em Patologia Bucal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Odontológicas**.

**Aprovado em 16 de setembro de 2021**




---

**Cristiane Cademartori Danesi, Dra. (UFSM-RS)**  
(Presidente da Banca/Orientadora)



---

**Alexandra da Silva Botezeli Stolz, Dra. (UFSM-RS)**  
(Examinadora)



---

**Márcia Rodrigues Payeras, Dra. (PUCRS)**  
(Examinadora)

Santa Maria, RS  
2021

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por quem eu sou e pelas pessoas que colocou em minha vida.

Aos meus pais, Roberto e Maria Inês, pelo amor incondicional, constante incentivo e por serem exemplos de vida para mim.

A meu irmão, Filipe, pelo carinho e exemplo de dedicação e sucesso.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristiane Cademartori Danesi, pela oportunidade de trabalho e aprendizado, mostrando-se uma excelente professora ao longo de minha pós-graduação.

A Universidade Federal de Santa Maria, por disponibilizar um curso de Odontologia de excelência e alta qualidade.

A todos que contribuíram de alguma forma no meu mestrado e, embora não estejam citados, não são esquecidos de minha gratidão

## RESUMO

### **AVALIAÇÃO DO CÁLCIO, FÓSFORO, PARATORMÔNIO E FOSFATASE ALCALINA SÉRICOS EM RATOS SOB O EFEITO DE MEDICAMENTOS ANTIRREABSORTIVOS E EXODONTIA**

AUTOR: Gabriel Bassan Marinho Maciel

ORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cristiane Cademartori Danesi

A osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos (MRONJ) é uma patologia óssea severa e debilitante cuja etiopatogenia não está totalmente esclarecida, bem como ainda não existe um tratamento padrão realmente efetivo para a condição. Desde os primeiros relatos, em 2003, investiga-se uma possível correlação entre parâmetros séricos do metabolismo ósseo com o desenvolvimento da MRONJ. Contudo, os achados são divergentes e ainda não há consenso na comunidade científica quanto tal associação. O objetivo deste estudo foi mensurar os parâmetros séricos ósseos de cálcio, fósforo, paratormônio (PTH) e fosfatase alcalina (FA) de 36 ratos Wistar machos em estágio de risco para MRONJ. Para isso, os animais receberam aplicações dos medicamentos antirreabsortivos: alendronato (AL), 1 mg/Kg; ácido zoledrônico (ZL), 0,06 mg/Kg; denosumab (Dmab), 0,25 mg/Kg. Após os tratamentos, os animais foram submetidos à exodontia do primeiro molar inferior direito hígido. Passados 28 dias da extração, foi realizada a eutanásia por exsanguinação total e simultânea obtenção de amostras sanguíneas para avaliação bioquímica de cálcio, fósforo, PTH e FA. Constatou-se que a administração de AL ou ZL reduziu a concentração sérica de cálcio ( $P > 0.05$ ), ao passo que a administração de Dmab a elevou ( $P > 0.05$ ). Nos três fármacos estudados, verificou-se um declínio na concentração de fósforo, que foi significativo apenas nos animais que receberam ZL ( $P < 0.05$ ). Não foram observadas variações na concentração do PTH em nenhum dos três tratamentos. A atividade sérica da FA elevou-se no tratamento com Dmab ( $P > 0.05$ ) e diminuiu com a administração de AL ou ZL ( $P > 0.05$ ). Conhecer o comportamento de parâmetros séricos ósseos é fundamental para aprofundar o entendimento da etiopatogenia da MRONJ. Os parâmetros séricos podem ser úteis em pesquisas futuras de estratégias preventivas pré-operatórias em pacientes sob risco que precisam realizar intervenções cirúrgicas orais.

**Palavras-chave:** Osteonecrose. Ratos. Alendronato. Ácido Zoledrônico. Denosumab

## ABSTRACT

### EVALUATION OF SERUM CALCIUM, PHOSPHORUS, PARATHORMONIUM AND ALKALINE PHOSPHATASE IN RATS UNDER THE EFFECT OF ANTIRESORPTIVE DRUGS AND DENTAL EXTRACTION

AUTHOR: Gabriel Bassan Marinho Maciel  
ADVISER: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cristiane Cademartori Danesi

Medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) is a severe and debilitating bone pathology whose etiopathogenesis is not fully understood, and there is still no effective standard treatment for the condition. Since the first reports, in 2003, a possible correlation between serum parameters of bone metabolism and the development of MRONJ has been investigated. However, the findings are contrasting and there is still no consensus in the scientific community regarding such an association. The aim of this study is to measure the bone serum parameters of calcium, phosphorus, parathormone (PTH) and alkaline phosphatase (AP) of 36 male Wistar rats at risk stage for MRONJ. For this reason, the animals received applications of anti-resorptive drugs: alendronate (AL), 1 mg/Kg; zoledronic acid (ZL), 0.06 mg/Kg; denosumab (Dmab), 0.25 mg/Kg. After the treatments, the animals underwent extraction of the healthy lower right molar. After 28 days of the extraction, euthanasia was performed by total exsanguination and simultaneous blood samples were obtained for biochemical evaluation of calcium, phosphorus, PTH and AP. Administration of AL or ZL was found to reduce serum calcium concentration ( $P > 0.05$ ), whereas administration of Dmab increased it ( $P > 0.05$ ). In the three medications studied, there was a decline in phosphorus concentration, which was significant only in animals that received ZL ( $P < 0.05$ ). No variations in PTH concentration were observed in any of the three treatments. Serum AP activity increased with Dmab treatment ( $P > 0.05$ ) and decreased with AL or ZL administration ( $P > 0.05$ ). Knowing the behavior of bone serum parameters is essential to deepen the understanding of the etiopathogenesis of MRONJ. Serum parameters may be useful in future research on preoperative preventive strategies in patients at risk who need to undergo oral surgical interventions.

**Keywords:** Osteonecrosis. Rats. Alendronate. Zoledronic Acid. Denosumab.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Bisfosfonato e pirofosfato .....	42
Figura 2 – Etidronato, ácido clodrônico e tiludronato.....	44
Figura 3 – Pamidronato e alendronato.....	45
Figura 4 – Ibandronato .....	47
Figura 5 – Risedronato e ácido zoledrônico .....	48
Figura 6 – Mronj.....	52
Figura 7 – Sondagem através de fístula.....	55



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Ångström
AAOMS	Associação Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais
<i>Ad libitum</i>	A vontade
AL	Alendronato
ANT	Translocase de Nucleotídeo de Adenina
AppCCl <sub>2</sub> p	Clodronato de AMP
ApppI	Éster isopentenílico do ATP
ATP	Adenosina trifosfato
BFs	Bisfosfonatos
BMU	Unidade Básica Multicelular
BRC	Compartimento de Reabsorção Óssea
BRONJ	Osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos
BSP	Sialoproteína óssea
CBFA1	Fator de ligação ao núcleo alfa
CN	Grupo Controle Negativo
CNAL	Grupo Alendronato Negativo
CNDmab	Grupo Denosumab Negativo
CZN	Grupo Ácido Zoledrônico Negativo
CTHRC1	Proteína contendo repetição de tripla hélice de colágeno 1
CTX	Telo-peptídeo C-terminal do Colágeno tipo I
Da	Dalton
DI	Decilitro
Dmab	Denosumab
FA	Fosfatase Alcalina
FDA	United States Food and Drug Administration
FPFS	Farnesil Pirofosfato Sintetase
FSD	Domínio de Secreção Funcional
g	Gramma
GAL	Grupo Alendronato
GDmab	Grupo Denosumab
GTPases	Guanosinas Trifosfato
GZ	Grupo Ácido Zoledrônico
HSC	Células-tronco da medula óssea
HGF	Fator de Crescimento do Hepatócito
IκB	Inibidor de NFκB
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
INF	Interferon
IP	Intraperitoneal
IV	Intravenoso
M-CSF	Fator estimulante de colônia de macrófagos
mg/Kg	Miligramma por quilogramma
mL	Mililitro
MMPs	Metaloproteinases
MRONJ	Osteonecrose dos Maxilares Relacionada a Medicamentos
NFATc1	Fator nuclear de células T ativadas c1
nm	Nanômetro

NTX	Telopeptídeo N-terminal do Colágeno tipo I
OCN	Osteocalcina
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPG	Osteoprotegerina
Osterix	Transcription fator Sp7; Fator de transcrição Sp7
PDGF-BB	Fator de crescimento BB derivado de plaquetas
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPi	Pirofosfato inorgânico
PTH	Paratormônio
RANKL	Ligante do receptor ativador do NF-kB
Runx2	Fator de transcrição 2 relacionado ao Runt
SC	Subcutâneo
S1P	Esfingosina-1 fosfato
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRAF	Fatores associados ao receptor TNF
TRAF6	Fator 6 associado ao receptor TNF
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
U	Micro mol/min
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
<b>2.1 TECIDO ÓSSEO</b> .....	17
2.1.1 Características Gerais .....	17
2.1.2 Osteoblastos .....	20
2.1.3 Osteoclastos .....	23
2.1.4 Osteócitos .....	28
2.1.5 Remodelação óssea .....	29
<b>2.2 PARÂMETROS DO METABOLISMO ÓSSEO</b> .....	32
2.2.1 Cálcio .....	33
2.2.2 Fósforo .....	34
2.2.3 Paratormônio (PTH) .....	35
2.2.4 Fosfatase Alcalina (FA) .....	38
<b>2.3 DISTÚRBIOS DO METABOLISMO ÓSSEO</b> .....	40
<b>2.4 MEDICAMENTOS ANTIRREABSORTIVOS</b> .....	41
2.4.1 Bisfosfonatos .....	41
2.4.1.1 Bisfosfonatos da Primeira Geração .....	44
2.4.1.2 Bisfosfonatos da Segunda Geração .....	45
2.4.1.3 Bisfosfonatos da Terceira Geração .....	48
2.4.2 Denosumab .....	50
<b>2.5 MRONJ</b> .....	52
2.5.1 Características Gerais .....	52
2.5.2 Sinais e Sintomas .....	54
2.5.3 Diagnóstico .....	54
2.5.4 Prevalência .....	56
2.5.5 Etiopatogenia .....	57
2.5.6 Fatores de risco .....	58
2.5.7 Tratamento .....	60
2.5.8 Parâmetros séricos e MRONJ .....	61
<b>2.6 MODELOS ANIMAIS</b> .....	63
<b>3 MANUSCRITO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO BRAZILIAN ORAL RESEARCH</b> .....	69
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	91
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	93
<b>ANEXO A</b> .....	111

**ANEXO B .....113**

## 1 INTRODUÇÃO

A osteonecrose dos maxilares associada a medicamentos (MRONJ) é uma condição severa e debilitante que afeta a capacidade de remodelação e vascularização dos ossos maxilares, culminando no surgimento de exposição óssea necrótica em áreas de trauma na cavidade oral (SOUSA et al., 2018; ALDHALAAN; BAQAIS; AL-OMAR, 2020).

Os dois principais agentes etiológicos da MRONJ são a exodontia (KAWAHARA; KUROSHIMA, 2021) e o uso de medicamentos antirreabsortivos (YANG et al., 2019), fármacos empregados no tratamento de distúrbios do metabolismo ósseo como a osteoporose, a doença de Paget e o mieloma múltiplo (TUCK, 2020; NGUYEN; BOUIN; STE-MARIE, 2021; OZYURTSEVEN et al., 2021).

Os medicamentos antirreabsortivos como os bisfosfonatos e o denosumab (CAIRES et al., 2017) têm grande potencial em inibir a atividade dos osteoclastos, as células responsáveis pela reabsorção óssea (UDAGAWA et al., 2021), o que resulta no fortalecimento dos ossos reduzindo o risco de fraturas patológicas (PASSÉRI et al., 2011).

A American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) classifica a MRONJ em cinco estágios (NICA et al., 2021): o estágio “em risco” compreende os pacientes que estão sob tratamento com medicamentos antirreabsortivos mas não apresentam nenhuma evidência de osteonecrose. No estágio 0, não há sinais clínicos de osteonecrose, mas há sinais não específicos e alterações radiográficas (LOMBARD et al., 2016; KANG et al., 2018).

No estágio 1 há exposição de osso necrótico ou presença de fístula, mas sem sintomas nem sinais de infecção. O estágio 2 é o estágio 1, porém sintomático com infecção, dor e eritema. (LOMBARD et al., 2016; KANG et al., 2018). No estágio 3 há presença de osso necrótico exposto ou fístula intraoral que se expandem além dos limites do osso alveolar, com sinais e sintomas associados à infecção (ON et al., 2021).

Até o momento não existe um tratamento definitivo para a MRONJ (MORASCHINI et al., 2021), mas sim diferentes estratégias de manejo que variam conforme o estágio clínico da doença (ON et al., 2021), almejando o controle da dor, da infecção e da progressão da necrose óssea (NICOLATOU-GALITIS et al., 2019). Tendo em vista a gravidade e dificuldade de manejo da MRONJ, tem sido investigada a correlação entre os parâmetros séricos do metabolismo ósseo com o desenvolvimento da MRONJ (LAZAROVICI et al., 2010; KOTH et al., 2017; PEISKER et al., 2018).

Os parâmetros séricos do metabolismo ósseo são substâncias que permitem o acompanhamento das atividades de reabsorção ou de formação dos ossos, refletindo a ação de

osteoclastos ou de osteoblastos, respectivamente (VIEIRA, 1999; FANTASIA, 2009). O cálcio e o fósforo são elementos imprescindíveis para a mineralização óssea e regulação de diversos processos orgânicos (SUN et al., 2020; PALACIOS et al., 2021), tendo sua homeostase regulada em grande parte pelo paratormônio (PTH) (POOLE; REEVE, 2005).

O PTH é um hormônio polipeptídico produzido e secretado pelas glândulas paratireoides localizadas no pescoço, na porção posterior da tireóide (LOFRESE; BASIT; LAPPIN, 2019), que age ativamente nos processos de remodelação óssea (BOVBJERG et al., 2021). Além do PTH, o metabolismo ósseo é influenciado pela ação da fosfatase alcalina (FA) (CLARKE, 2008), uma ectoenzima (FISHER et al., 2007) presente na matriz calcificada e na membrana dos osteoblastos (VIEIRA, 1999).

A FA é imprescindível para a mineralização dos ossos (BRICHACEK; BROWN, 2019) uma vez que cliva o pirofosfato inorgânico, um inibidor natural da calcificação, aumentando com isso a concentração local de fósforo, promotor da mineralização (MURSHED, 2018). Além disso, a FA altera fosfoproteínas para que essas estimulem a calcificação óssea (CLARKE, 2008).

Alterações dos níveis séricos de cálcio, fósforo, PTH e FA são encontrados em diferentes processos patológicos. Baixas concentrações de cálcio no organismo podem levar ao raquitismo em crianças e a osteomalácia em adultos, bem como aumenta o risco de osteoporose (PALACIOS et al., 2021).

Quanto ao fósforo, reduções severas de fosfato no organismo podem causar insuficiência cardíaca e respiratória, enquanto que níveis elevados estão associados a calcificação da artéria coronária, deterioração da função renal, envelhecimento precoce e aumento da mortalidade (SERNA; BERGWITZ, 2020).

O PTH, quando em níveis elevados, torna-se uma toxina urêmica e induz a perda mineral óssea, bem como pode estimular a calcificação de vasos e válvulas, anemia, cardiomiopatia e hipertensão (JAQUETO et al., 2016).

Valores séricos reduzidos de FA estão relacionados a doença de Wilson e a leucemia (HAN et al., 2020), enquanto que o aumento da sua concentração sérica é associada a obstrução biliar, resposta à leucemia, linfoma, tumores ósseos osteoblásticos, osteomalácia, diabetes, mineralização esquelética excessiva, doença de Paget e Alzheimer (BRICHACEK; BROWN, 2019; HAN et al., 2020).

Modelos animais são empregados no estudo da MRONJ a fim de esclarecer sua etiopatogenia, testar novos tratamentos e buscar meios de prevenir o seu desenvolvimento em pacientes de risco (ALLEN, 2007; SHARMA et al., 2013). Um modelo animal para a MRONJ

deve simular as condições presentes nos casos em seres humanos, como a administração de fármacos antirreabsortivos e a presença de trauma na cavidade oral, como exodontias (ALLEN, 2007; WAN et al., 2020). Dessa forma, espera-se a indução de áreas de exposição óssea persistentes, porém modelos de MRONJ que não desenvolvem osso exposto clinicamente também podem ser elaborados, pois acredita-se que a exposição óssea pode ser um efeito tardio dessa patologia (SHARMA et al., 2013).

Entretanto, não existe um modelo animal padrão para a MRONJ que replique com precisão a sua realidade clínica em humanos, isto é, que abranja todos os fatores que podem estar envolvidos em sua patogênese (NETO et al., 2016).

O rato é o animal mais empregado em pesquisas científicas historicamente (FAGUNDES e TAHA, 2004). Apesar da grande semelhança fisiológica entre roedores e o homem, a extrapolação dos resultados encontrados nesses modelos para os seres humanos deve ser feita com cautela (DAMATTA, 2010). Em ratos, a relação entre os parâmetros séricos do metabolismo ósseo e a MRONJ foi analisada em poucos estudos que não encontraram conformidade quanto a sua associação (NETO et al., 2013; OH et al., 2014).

Nesse contexto, o presente trabalho objetivou mensurar os parâmetros séricos de cálcio, fósforo, PTH e FA em ratos Wistar em situação de risco para o desenvolvimento de MRONJ. Para isso, os animais receberam aplicações de três medicamentos antirreabsortivos (alendronato, ácido zoledrônico e denosumab) seguindo protocolos estabelecidos na literatura e foram submetidos à exodontia do primeiro molar inferior direito hígido. Após pesquisa em diversas bases de dados, constata-se que este trabalho é pioneiro na avaliação simultânea dos níveis séricos de cálcio, fósforo, PTH e FA em ratos Wistar tratados com alendronato, ácido zoledrônico e denosumab.





## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 TECIDO ÓSSEO

#### 2.1.1 Características gerais

Os ossos são constituídos por um tecido conjuntivo especializado, metabolicamente ativo, formado por diferentes tipos celulares em meio a uma matriz extracelular de colágeno calcificada (BUCK; DUMANIAN, 2012). Os ossos são as principais estruturas responsáveis pela sustentação do organismo, possibilitando movimentos e a locomoção do corpo, além de garantirem a proteção de estruturas vitais (SINGH; BRAY; HALL-CRAGGS, 2018).

Os ossos participam da regulação de diversos processos metabólicos, endócrinos e hematopoiéticos, concentrando inúmeros fatores de crescimento e citocinas, bem como envolvem-se diretamente na homeostase mineral, sendo importantes reservas de íons cálcio e fósforo (CLARKE, 2008; SINGH; BRAY; HALL-CRAGGS, 2018).

A matriz dos ossos é composta principalmente por minerais, que correspondem a cerca de 50 a 70% do osso e lhe conferem rigidez mecânica e capacidade de suportar cargas (RALSTON, 2017). Os minerais predominantes no tecido ósseo são o cálcio e o fósforo, na forma de cristais de hidroxiapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (MURSHED, 2018).

Estão presentes também, mas em menores proporções, carbonato, magnésio e grupos hidroxila isolados. O diâmetro máximo dos cristais de hidroxiapatita não ultrapassa 200 Å, sendo menores e mais solúveis em comparação aos cristais geológicos de hidroxiapatita (CLARKE, 2008).

A matriz orgânica, isto é, 20 a 40% do osso (CLARKE, 2008), é constituída por uma rede interligada de aproximadamente 20 tipos de proteínas, sendo a principal o colágeno tipo I (UNAL; CREECY; NYMAN, 2018) que corresponde a cerca de 90% dessas (GARNERO, 2015). O restante são outras proteínas colagenosas, não-colagenosas e fatores de crescimento (CLARKE, 2008).

O colágeno tipo I é uma proteína macromolecular fibrilar responsável por conferir aos ossos elasticidade e resistência a tensões (SILVA; PENNA, 2012; PRESTES et al., 2013). O colágeno tipo I é composto por duas cadeias peptídicas  $\alpha_1$  entrelaçadas com sua cadeia isômera  $\alpha_2$ , formando assim uma haste tripla cuja porção central está na forma helicoidal e suas extremidades amínica e carboxílica na forma globular (PRESTES et al., 2013).

A molécula de colágeno tem um comprimento aproximado de 280 nm e massa molecular em cerca de 300.000 Da. Cada cadeia polipeptídica da sua tripla hélice apresenta cerca de mil aminoácidos. A sequência de aminoácidos nas moléculas de colágeno é geralmente tripeptídica, com glicina-x-prolina ou glicina-x-hidroxi-prolina, em que o “x” varia entre os 20 aminoácidos existentes (SILVA; PENNA, 2012).

As moléculas de tropocolágeno organizam-se em fibrilas, as quais unem-se entre si através de ligações cruzadas de piridínio, um tipo especial de união covalente oriunda da interação entre grupos aldeídos e grupos aminos livres (RALSTON, 2017). As fibrilas formam as fibras de colágeno as quais, por sua vez, se organizam em feixes (SILVA; PENNA, 2012). O colágeno tipo I compreende cerca de 95% de todo o colágeno ósseo, com os outros tipos dessa proteína (colágeno III e V) servindo para regular o diâmetro de fibrilas do colágeno tipo I (GARNERO, 2015).

Quanto as proteínas não-colagenosas que formam a matriz orgânica, destacam-se a osteonectina, a mais abundante, que é associada ao desenvolvimento de osteoblastos e à mineralização da matriz (CLARKE, 2008) e a fibronectina, cujo papel é mediar a adesão de células à matriz óssea (RALSTON, 2017). Por fim, além dos minerais e da matriz orgânica, o osso é composto por moléculas de água (5 a 10%) e por lipídeos (menos de 3%) (CLARKE, 2008).

Defeitos na mineralização óssea explicam inúmeras patologias como raquitismo e osteomalácia, nas quais não há cálcio e fosfato em níveis satisfatórios (RALSTON, 2017). A calcificação insuficiente também é vista na hipofosfatasia, uma condição em que uma mutação genética afeta a enzima fosfatase alcalina (FA) que passa a não degradar o pirofosfato, um inibidor da mineralização (RALSTON, 2017; MURSHED, 2018).

O tecido ósseo é classificado em dois tipos: osso cortical e osso trabecular. Sítios distintos do esqueleto exibem proporções diferentes de osso cortical e trabecular na sua composição (CLARKE, 2008). O tecido ósseo cortical é de aspecto sólido e denso, tendo baixa área de superfície e corresponde a 80% do esqueleto (SINGH; BRAY; HALL-CRAGGS, 2018).

O osso cortical é constituído por lamelas calcificadas concêntricas que envolvem o osso trabecular (SINGH; BRAY; HALL-CRAGGS, 2018). No osso cortical são encontradas estruturas cilíndricas conhecidas como ósteons, ou sistemas harvesianos, que envolvem um canal central o qual abriga vasos sanguíneos (CLARKE, 2008).

À exceção das articulações, a superfície externa do padrão cortical é revestida por perióstio, uma bainha de tecido conjuntivo fibroso fundamental para o crescimento ósseo

apositional e reparo de fraturas. O padrão cortical é predominante nas hastes de ossos longos e no colo do fêmur (RALSTON, 2017; SINGH; BRAY; HALL-CRAGGS, 2018).

O segundo tipo ósseo é o trabecular, o qual é semelhante a uma rede de favos de mel com placas e hastes trabeculares em meio a medula óssea (CLARKE, 2008). O padrão trabecular corresponde a 20% do esqueleto, sendo encontrado no centro de ossos longos, planos e vértebras (RALSTON, 2017).

O padrão trabecular tem um caráter esponjoso, sendo menos denso e com metabolismo mais intenso que o osso cortical. O osso trabecular também é formado por ósteons, porém eles têm formato semilunar, sendo diferentes dos sistemas harvesianos do padrão cortical (RALSTON, 2017).

A face interior do osso trabecular, bem como do osso cortical, é recoberta pelo endóstio, uma membrana que contém vasos sanguíneos, osteoblastos e osteoclastos. Nessa face interior, a taxa de remodelação é maior do que na face externa recoberta pelo perióstio, com a reabsorção superando a deposição óssea, o que acaba ampliando a cavidade medular conforme o indivíduo envelhece (CLARKE, 2008; BUCK; DUMANIAN, 2012).

A cavidade central de ossos axiais e longos é preenchida pela medula óssea, um órgão encarregado da hematopoiese, isto é, a produção de hemácias, granulócitos, monócitos, linfócitos e plaquetas (TRAVLOS, 2006). A medula óssea produz diariamente mais de cem bilhões de células sanguíneas (SINGH; BRAY; HALL-CRAGGS, 2018). Esse órgão consiste em ilhas de tecido hematopoiético (medula óssea vermelha) junto com células adiposas (medula óssea amarela) e macrófagos em meio a uma malha de osso trabecular ricamente vascularizada (TRAVLOS, 2006).

A hematopoiese é regulada por um microambiente, ou nicho, formado por células reticulares adventícias, células endoteliais, células de revestimento ósseo, macrófagos, adipócitos e elementos da matriz extracelular. Esse nicho também reconhece e retém células-tronco hematopoiéticas, fornecendo citocinas e fatores para proliferação, diferenciação e maturação das mesmas (WANG; ZHONG, 2018).

Os ossos são ricamente vascularizados (SINGH; BRAY; HALL-CRAGGS, 2018). Com exceção da cartilagem articular e da placa de crescimento, vasos sanguíneos são encontrados em todas as regiões do sistema esquelético (SIVARAJ; ADAMS, 2016). A vascularização é fundamental para o desenvolvimento e o crescimento ósseo, para os processos de remodelação e na reparação de fraturas (CARULLI; INNOCENTI; BRANDI, 2013).

Os ossos, através dos osteoblastos, secretam fatores que estimulam a produção de vasos sanguíneos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e a eritropoetina (LOPES

et al., 2018). A angiogênese e a osteogênese, portanto, são processos intimamente ligados, cada um promovendo sinergicamente o outro (SIVARAJ; ADAMS, 2016).

A irrigação óssea ocorre através de artérias que distribuem o sangue em uma extensa rede de capilares a qual é drenada por uma veia no centro da diáfise. Alterações na irrigação óssea podem ser fortes indicativos de doenças. A perfusão sanguínea, por exemplo, é aumentada em situações de inflamação ou neoplasia, enquanto que é reduzida na doença vascular periférica ou em pacientes com anomalias nos eritrócitos (SINGH; BRAY; HALL-CRAGGS, 2018).

A formação dos ossos ocorre na etapa embrionária quando células-tronco mesenquimais migram até sítios específicos do organismo para ali formarem condensações que delineiam a forma e as dimensões do futuro osso (BERENDSEN; OLSEN, 2016).

Existem dois tipos de ossificação: a intramembranosa e a endocondral. Se a célula mesenquimal diferencia-se diretamente em um osteoblasto, tem-se a ossificação intramembranosa, o processo de formação de ossos como a mandíbula, a maxila e a calvária do crânio (RALSTON, 2017). Em contrapartida, a ossificação endocondral é caracterizada pela produção inicial de um modelo cartilaginoso que gradualmente sofre calcificação (GHIMIRE et al., 2021).

Na ossificação endocondral, as células-tronco se diferenciam em condrócitos que compõem a matriz cartilaginosa. Essa matriz é então invadida por tecido vascular e células osteoprogenitoras que formam centros de ossificação a partir dos quais a mineralização ocorre (BERENDSEN; OLSEN, 2016).

O primeiro centro de ossificação surge no meio do modelo e depois nas extremidades da estrutura (XIE; CHAGIN, 2021). Nesses centros secundários de ossificação, a substituição da cartilagem por tecido mineralizado ocorre exceto na superfície externa, onde forma-se a cartilagem articular. A ossificação endocondral forma os ossos longos dos membros, assim como costelas, pelve e vértebras (RALSTON, 2017).

O tecido ósseo abriga três tipos celulares principais que desempenham funções específicas e coordenadas entre si: os osteoblastos, os osteoclastos e os osteócitos (WANG et al., 2021).

### **2.1.2 Osteoblastos**

A formação óssea fica ao encargo dos osteoblastos, células que depositam camadas de matriz compostas principalmente por colágeno tipo I que se mineralizam progressivamente (SALHOTRA et al., 2020). Os osteoblastos correspondem a cerca de 4% a 6% de todas as

células ósseas (FLORENCIO-SILVA et al., 2015), estando ativos por um período de aproximadamente dois a três meses (MAEDA et al., 2019).

Morfologicamente, os osteoblastos são células cúbicas polarizadas que apresentam retículo endoplasmático rugoso, vesículas secretoras e aparelho de Golgi bem desenvolvidos para a produção e deposição de proteínas (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

Após a formação da matriz óssea, os osteoblastos podem seguir por três possíveis caminhos: eles podem sofrer apoptose, o que ocorre com aproximadamente 50-70% deles (SINGH; BRAY; HALL-CRAGGS, 2018), podem se diferenciar em osteócitos ou ainda podem se diferenciar em células quiescentes do revestimento ósseo (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

As células do revestimento ósseo, juntamente com os osteócitos, são as células predominantes no tecido mineralizado (GRABOWSI, 2015). Essas diferenciações de osteoblastos recobrem a superfície óssea, onde não há atividade de reabsorção nem deposição mineral (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

Morfologicamente são achatadas, apresentando um núcleo delgado e com poucas organelas citoplasmáticas (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). Entretanto, mediante exposição às forças mecânicas ou ao paratormônio (PTH), as células do revestimento ósseo podem se rediferenciar em osteoblastos, restabelecendo sua capacidade de secreção, seu formato cúbico e aumentando seu tamanho (CLARKE, 2008).

As células do revestimento estão associadas a regulação do fluxo de íons minerais do fluido extracelular ósseo, servindo como uma barreira entre o sangue e o tecido mineralizado (CLARKE, 2008). Ademais, as células do revestimento impedem o contato direto da matriz óssea com osteoclastos em situações de não-reabsorção, produzem osteoprotegerina (OPG) e o ligante do receptor ativador do NF- $\kappa$ B (RANKL), moléculas importantes para a diferenciação de osteoclastos (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

Os osteoblastos se originam a partir de células-tronco mesenquimais, as quais primeiramente formam células osteocondroprogenitoras sob regulação do fator de transcrição SOX9. Essas células osteocondroprogenitoras podem produzir tanto condrócitos quanto osteoblastos e, para a diferenciação desses, são necessários os fatores de transcrição Runx2 (fator de transcrição 2 relacionado ao runt) e Osterix (SP7) (GRABOWSI, 2015).

O Runx2, conhecido também por CBFA1 (subunidade alfa-1 do fator de ligação ao núcleo), é membro da família dos fatores de transcrição Runx e regula a diferenciação inicial dos osteoblastos, atuando também na morfogênese óssea, no desenvolvimento de cartilagens, dentes e vasos sanguíneos (FLORENCIO-SILVA et al., 2015; VIMALRAJ et al., 2015).

Mutações no Runx2 podem desencadear patologias como metástases em câncer de mama, displasia fibrosa, hipertrofia de condrócitos e displasia cleidocraniana (VIMALRAJ et al., 2015).

O fator de transcrição Osterix é uma proteína com zinco em sua composição que pertence à família dos fatores de transcrição SP. O Osterix depende do Runx2 para sua expressão e suas mutações estão associadas a osteogênese imperfeita tipo XII (GRABOWSI, 2015). Após a fase de diferenciação, ocorre a etapa de proliferação dos progenitores de osteoblastos, uma fase marcada pela atividade da fosfatase alcalina (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

A transição dos pré-osteoblastos fusiformes para osteoblastos cuboidais é caracterizada por um aumento na expressão de Osterix juntamente pela secreção de proteínas como osteocalcina (OCN), sialoproteína óssea (BSP) I/II e colágeno tipo I (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

Os osteoblastos conseguem migrar sobre a superfície óssea até os pontos de deposição podendo, em alguns casos, cobrir distâncias na faixa de milímetros. Os osteoblastos indiferenciados têm maior potencial de migração do que aqueles que já estão maduros e prontos para a deposição óssea. Para sua fixação na superfície óssea, são empregadas integrinas e, através da força de adesão gerada, os osteoblastos controlam sua migração (THIEL et al., 2018). A atração dos osteoblastos até locais específicos ocorre por diferentes gradientes quimioatrativos liberados da matriz pela ação dos osteoclastos, por secreções de células adjacentes, ou pela detecção de sinais mecânicos que os guiam pelo osso reabsorvido ou pelo osteóide, as duas superfícies mais comuns de movimentação (THIEL et al., 2018).

Os osteoblastos desempenham importante papel no controle dos osteoclastos através da regulação da produção de osteoprotegerina (OPG), um inibidor da diferenciação das células reabsortivas ósseas (CAWLEY et al., 2020). Esse controle de OPG ocorre por meio da sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina nos osteoblastos, um mecanismo essencial para a manutenção da massa óssea (GRABOWSI, 2015).

As Wnt são glicoproteínas (GRABOWSI, 2015) que atuam em receptores na membrana celular compostos por um complexo de proteínas, isto é, um membro da família Frizzled de sete proteínas receptoras transmembranares mais os receptores 5 e 6 relacionados à lipoproteína de baixa densidade (Lrp5/6) (RUDNICKI; WILLIAMS, 2015).

Ao ser ativado, esse receptor na membrana atrai para si os inibidores da  $\beta$ -catenina no citoplasma, o que permite o acúmulo dessa proteína no meio intracelular. A  $\beta$ -catenina em excesso é então translocada até o núcleo dos osteoblastos para interagir com fatores de

transcrição e assim controlar a expressão de OPG (MAEDA et al., 2019). Nos precursores mesenquimais de osteoblastos, a  $\beta$ -catenina é necessária para sua diferenciação e sobrevivência, enquanto que as proteínas Wnt agem impedindo a apoptose (DUAN; BONEWALD, 2016).

A mineralização do osteóide no processo de formação óssea, isto é, do osso ainda não calcificado, é regulada pelos hormônios sistêmicos vitamina D e PTH, além de proteínas da família SCLP que auxiliam na produção dos cristais minerais (GRABOWSKI, 2015).

A calcificação do osteóide pode ser inibida pelo pirofosfato inorgânico, um derivado do fósforo composto por dois grupos fosfato unidos por uma ligação éster. O pirofosfato impede a calcificação patológica de tecidos moles pelo bloqueio da agregação de íons cálcio e fósforo ao cristal de apatita, impossibilitando assim o seu crescimento (MURSHED, 2018).

### 2.1.3 Osteoclastos

Os agentes responsáveis por reabsorver o tecido ósseo são os osteoclastos, células gigantes multinucleadas (UDAGAWA et al., 2021) de origem hematopoiética descritas pela primeira vez em 1873, pelo suíço Albert Kolliker (NAGY; PENNINGER, 2015). Os osteoclastos correspondem a cerca de 1% das células ósseas (BONEWALD, 2017), sendo encontrados em regiões de reabsorção dentro de cavidades escavadas na matriz denominadas lacunas de Howship (BUCK; DUMANIAN, 2012).

Podem-se localizar osteoclastos também em tumores de células gigantes na bainha do tendão, em áreas de sinovite vilonodular pigmentada e em carcinomas primários, como os de mama, pulmão, bexiga e pâncreas (BOYCE et al., 2018). Além do seu papel na reabsorção mineral, os osteoclastos influenciam na formação óssea regulando os osteoblastos através da expressão de clastocinas. As clastocinas são moléculas de sinalização capazes de induzir osteogênese e englobam a TRAP, S1P, BMP6, Wnt10b, fator de crescimento do hepatócito (HGF) e a proteína contendo repetição de tripla hélice de colágeno 1 (CTHRC1) (SEJDINAJ; ZHANG, 2017).

Ademais, os osteoclastos induzem a angiogênese através do fator de crescimento BB derivado de plaquetas (PDGF-BB) (DRISSI; SANJAY, 2016), mantêm normal a função endócrina óssea produzindo osteocalcina (SEJDINAJ; ZHANG, 2017) e também atuam na criação de nichos de células-tronco hematopoiéticas na medula óssea (DRISSI; SANJAY, 2016).

Os osteoclastos derivam da linhagem mielóide de células-tronco da medula óssea (HSC) (SEJDINAJ; ZHANG, 2017). Essas células têm capacidade de autorrenovação e originam todos os tipos de células hematopoiéticas através de linhagens distintas (ONO; NAKASHIMA, 2018).

Quando as HSC deixam de se autorrenovar, elas se tornam células multipotentes que formam três linhagens distintas de progenitores oligopotentes: os linfóides, os megacariócitos/eritrócitos e os progenitores mielóides comuns (ONO; NAKASHIMA, 2018). A partir dos progenitores mielóides comuns derivam os pré-osteoclastos mononucleares, assim como monócitos e macrófagos (ONO; NAKASHIMA, 2018). Essas células precursoras de osteoclastos são então transferidas da medula óssea para a circulação sanguínea por intermédio da esfingosina-1 fosfato (S1P), um esfingolípido secretado por hemácias e plaquetas (SEJDINAJ; ZHANG, 2017).

A osteoclastogênese é regulada principalmente por duas citocinas liberadas por osteoblastos e osteócitos: o fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF) e o ligante do receptor ativador do NF- $\kappa$ B (RANKL) (ANESI et al., 2019). A citocina M-CSF é imprescindível para regular a proliferação, manutenção e diferenciação dos osteoclastos. Nas células-tronco, a sinalização do M-CSF ativa os fatores de transcrição PU.1 e MITF e estimula sua diferenciação em pré-osteoclastos (AMARASEKARA et al., 2018).

Nos pré-osteoclastos, a M-CSF se conecta ao seu receptor M-CSFR codificado pelo gene *c-fms* e provoca sua dimerização, fosforilação e ativação. Através das proteínas adaptadoras Grb2, Sos e Ras G, o receptor ativa a família das quinases serina/treonina, ou MAPK (MAP quinase) (ANESI et al., 2019).

As MAPK, por sua vez, ativam o fator de transcrição AP-1 que se move até o núcleo da célula para realizar a transcrição de genes que promovem a divisão celular (BOYCE et al., 2018; ANESI et al., 2019). A ligação da M-CSF também aciona a enzima PI3K que ativa outras duas quinases, a AKT e mTOR. Essas sinalizações culminam na inibição da apoptose dos precursores de osteoclastos, permitindo assim a sua proliferação (ANESI et al., 2019).

A citocina M-CSF também induz os pré-osteoclastos a expressar o receptor RANK que, quando se conecta ao seu ligante RANKL, desencadeia uma sequência de sinalizações intracelulares que ativam a osteoclastogênese (NAGY; PENNINGER, 2015; MATSUMOTO; ENDO, 2021).

O RANKL é uma proteína transmembrana homotrimérica tipo II presente nos osteoblastos, osteócitos, linfócitos T ativados e outras células da medula óssea. Nos osteoblastos, através de proteólise de enzimas extracelulares como desintegrina, metaloprotease



e metaloprotease-7, o RANKL é liberado da superfície celular e se conecta ao RANK nos pré-osteoclastos mononucleares (NAGY; PENNINGER, 2015).

O RANK, ou membro da superfamília TNRF11a, é um receptor presente na membrana celular dos pré-osteoclastos (NAGY; PENNINGER, 2015; AMARASEKARA et al., 2018). Ao interagir com o RANKL, o RANK recruta até si uma família de proteínas denominadas fatores associados ao receptor TNF (TRAF), sendo a principal a molécula adaptadora TRAF6 (fator 6 associado ao receptor TNF) (ANESI et al., 2019).

A TRAF6 causa a degradação do Inibidor de NFkB (IkB), uma proteína responsável pela inativação do fator de transcrição NFkB. Sem o IkB, o NFkB não é bloqueado e consegue se deslocar até o núcleo para ativar a transcrição dos seus genes, o que permite a expressão do fator nuclear de células T ativadas c1 (NFATc1), o principal regulador da diferenciação dos osteoclastos (ANESI et al., 2019).

O TRAF6 também inicia a via de sinalização do c-src (NAGY; PENNINGER, 2015) a qual está associada à função de proteção celular pois evita a apoptose do pré-osteoclasto. A ligação do RANKL reorganiza o citoesqueleto do pré-osteoclasto na fusão com outros pré-osteoclastos, para que assim formem um único osteoclasto multinucleado (MIYAMOTO, 2011). A união dessas células precursoras é regulada pela proteína transmembrana específica de células dendríticas (DC-STAMP) (RALSTON, 2017), cuja expressão é regulada pelo NFATc1 (MIYAMOTO, 2011).

O RANKL, juntamente do M-CSF, é responsável por manter os osteoclastos ativos dentro das lacunas de Howship por um período de aproximadamente 30 dias, a vida útil média de um osteoclasto (BOYCE et al., 2018).

A osteoclastogênese, contudo, pode ser iniciada diretamente sem o RANKL através da citocina TNF- $\alpha$ . Na presença do M-CSF, a TNF- $\alpha$  ativa a via de sinalização NF- $\kappa$ B necessária para a maturação dos osteoclastos (MARAHLEH et al., 2019). Nos osteoblastos e células T ativadas, a TNF- $\alpha$  provoca a expressão de M-CSF e RANKL, induzindo assim a produção de osteoclastos indiretamente (AMARASEKARA et al., 2018).

Desse modo, os linfócitos T ativados que expressam o RANKL causam quadros de perda óssea em doenças que apresentam intensa resposta inflamatória, como a artrite reumatóide. Ademais, o RANK e o RANKL estão associados à maturação e conservação das células do sistema imune, particularmente nos linfócitos T e B (PEREIRA; PEREIRA, 2004; NAGY; PENNINGER, 2015). Além do RANKL e do M-CSF, a osteoclastogênese é regulada também pelo fator de necrose tumoral (TNF), pelas interleucinas (IL) IL-1, IL-6, IL-7, IL-8,

IL-11, IL-15, IL-17, IL-23, IL-34 e por  $H^+$  e  $Mg^{2+}$  extracelulares (AMARASEKARA et al., 2018).

Com o objetivo de limitar a formação excessiva de osteoclastos e assim impedir uma reabsorção óssea exagerada, a interação do RANKL com o RANK pode ser inibida por moléculas de osteoprotegerina (OPG) (BOYCE et al., 2018).

A OPG, ou fator inibidor dos osteoclastos, é uma proteína codificada pelo gene TNFRSF11B (NAGY; PENNINGER, 2015) que se liga com alta afinidade ao RANKL nos osteoblastos de modo a impedir sua conexão ao RANK dos pré-osteoclastos (WANG et al., 2021). Enfermidades em que há alterações nesse gene, tais como a doença de Paget juvenil (NAGY; PENNINGER, 2015) e a hiperfosfatase idiopática (BOYCE et al., 2018) levam a osteoporose e aumentam os riscos de fraturas decorrentes da intensa reabsorção óssea. A secreção de osteoprotegerina é realizada principalmente por osteoblastos (AMARASEKARA et al., 2018), mas também células cardíacas, hepáticas, renais e do baço podem expressá-la (BOYCE et al., 2018).

Além da OPG, outras moléculas estão envolvidas na inibição da osteoclastogênese, como as proteínas interferon (IFN)  $IFN\alpha$ ,  $IFN\beta$ ,  $IFN\gamma$ , as interleucinas IL-3, IL-4, IL-10, IL-12, IL-27, IL-33 e concentrações extracelulares significativas de  $Zn^{2+}$  (ANESI et al., 2019).

Os osteoclastos se fixam ao sítio de reabsorção com a mediação da integrina Alpha-v Beta-3. Essa proteína reconhece a sequência de aminoácidos RGD presentes na matriz óssea e a partir de então induz o citoesqueleto a realocar as organelas necessárias à reabsorção para o polo da célula mais próximo do osso (XU; TEITELBAUM, 2013).

Nesse setor do osteoclasto é então criado um compartimento reabsortivo, ou subosteoclástico, composto por filamentos de actina que formam um anel em volta de uma membrana pregueada (TAKITO; INOUE; NAKAMURA, 2018). A membrana pregueada é repleta de microvilosidades que aumentam sua área de contato com a superfície óssea (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). Para a correta formação da membrana pregueada, é imprescindível a ação da proteína c-src (RALSTON, 2017). O estudo de Soriano et al. (1991) analisou ratos com deficiência de c-src e constatou osteopetrose mesmo com um número expressivo de osteoclastos presentes, indicando o papel fundamental da membrana pregueada na reabsorção (LERNER; KINDSTEDT; LUNDBERG, 2019).

O compartimento reabsortivo faz parte da zona de vedação, ou zona clara no osteoclasto, a qual forma um microambiente isolado em que a reabsorção óssea ocorrerá (DELAISSE et al., 2021). Já no polo oposto ao compartimento subosteoclástico tem-se o domínio de secreção

funcional (FSD), uma região responsável pela remoção por transcitose dos produtos da degradação óssea do meio intracelular (TAKITO; INOUE; NAKAMURA, 2018).

A membrana pregueada do osteoclasto é ricamente povoada pela enzima  $H^+$ -ATPase, a qual atua como uma bomba lançando ao compartimento subosteoclástico extracelular os prótons  $H^+$  provenientes da quebra do ácido carbônico (XU; TEITELBAUM, 2013). A ação dessa bomba de prótons acidifica esse microambiente e dissolve a hidroxiapatita óssea permitindo a infiltração posterior na matriz orgânica de enzimas proteolíticas para degradar o colágeno (LERNER; KINDSTEDT; LUNDBERG, 2019).

No interior do osteoclasto, a quebra do ácido carbônico pela anidrase carbônica gera um acúmulo de  $HCO_3^-$  que é removido da célula por meio de um transportador passivo de cloreto e bicarbonato presente na membrana celular no FSD. Simultaneamente, esse transportador importa para o meio intracelular íons  $Cl^-$  que também serão mandados ao compartimento subosteoclástico por canais de cloreto na membrana pregueada (XU; TEITELBAUM, 2013).

Após a dissolução do tecido mineralizado, enzimas proteolíticas como metaloproteinases e catepsina K lisossômica alcançam a matriz orgânica óssea e iniciam a degradação do colágeno (TAKITO; INOUE; NAKAMURA, 2018; LERNER; KINDSTEDT; LUNDBERG, 2019).

À medida que o osteoclasto reabsorve o osso, ele forma a cavidade conhecida como lacuna de Howship (LERNER; KINDSTEDT; LUNDBERG, 2019). Finalizada a dissolução de um sítio, os osteoclastos precisam migrar até outro ponto da superfície óssea para continuar a reabsorção (XU; TEITELBAUM, 2013).

Esse processo pode ocorrer de duas formas. Ou os osteoclastos interrompem a reabsorção até alcançarem o outro sítio para então reativarem a liberação de prótons e enzimas, ou os osteoclastos continuam a reabsorção durante o seu deslocamento (TAKITO; INOUE; NAKAMURA, 2018).

No primeiro caso, observa-se um padrão de reabsorção de inúmeros poços escavados na matriz e separados uns dos outros. Já quando os osteoclastos dissolvem o osso em trânsito sobre o mesmo, forma-se um traçado contínuo, em trincheira (TAKITO; INOUE; NAKAMURA, 2018). Terminada a reabsorção, os osteoclastos se afastam da superfície óssea e sofrem apoptose (RALSTON, 2017).

### 2.1.4 Osteócitos

Os osteócitos são as células mais abundantes nos ossos, correspondendo cerca de 90-95% de todas as células ósseas (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). Os osteócitos são diferenciações de osteoblastos que ficaram retidos em lacunas em meio ao osteóide (HARIDY et al., 2021).

Os osteoblastos presos na matriz óssea passam por uma mudança radical em seu formato, indo de células cuboidais especializadas na secreção de proteínas a células dendríticas com corpo celular reduzido e com longas e delgadas projeções citoplasmáticas (SCHAFFLER et al., 2013; BOYCE et al., 2018).

Esses processos dendríticos surgem antes da calcificação da matriz e precisam de diversas metaloproteinases para o seu crescimento em extensão. Ossos que passam por várias remodelações durante a vida, tais como as costelas, apresentam muitas lacunas desprovidas de osteócitos, ao passo que ossos como os do ouvido interno, que não sofrem remodelação, preservam os mesmos osteócitos desde a sua formação (SCHAFFLER et al., 2013).

Os longos processos dendríticos dos osteócitos que ocupam o interior de canalículos formam uma rede por todo o osso mineralizado (RAGGATT; PARTRIDGE, 2010). Os canalículos são preenchidos por um fluido que sofre alterações em seu fluxo quando o osso recebe uma carga mecânica (BONEWALD, 2017).

Esse estresse por cisalhamento gera uma série de reações nos osteócitos com o objetivo de transformar um estímulo mecânico em sinalizações bioquímicas. Inicialmente é liberado cálcio intracelular, o qual ocasiona a liberação de ATP, óxido nítrico e prostaglandinas para que haja uma resposta anabólica à carga sofrida e proteção dos osteócitos contra a apoptose (FLORENCIO-SILVA et al., 2015; BONEWALD, 2017).

A prostaglandina PGE2 tem efeito parácrino sobre outros osteócitos a fim de garantir sua sobrevivência e está associada a iniciação da formação óssea anabólica. Quando comparado com osteoblastos ou fibroblastos, os osteócitos se apresentam mais sensíveis a estímulos mecânicos (BONEWALD, 2017).

Adicionalmente, o estresse por cisalhamento provoca a transcrição e tradução de genes e o alongamento dos prolongamentos dos osteócitos (BONEWALD, 2017). É por meio dessas projeções celulares que os osteócitos interagem entre si e com os osteoblastos na superfície óssea (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). Por outro lado, a falta de estímulo mecânico diminui a liberação de fatores anabólicos e estimula os osteócitos a inibir a atividade de osteoblastos por meio das moléculas de esclerostina e DDK-1, as quais também fomentam a produção local

de osteoclastos (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

Os osteócitos sintetizam diversas proteínas não colagenosas da matriz óssea como osteopontina, osteocalcina, proteína da matriz dentinária (DMP1), bem como proteoglicanos e ácido hialurônico. A osteopontina e a DMP1 são imprescindíveis para a manutenção da lacuna e dos canalículos dos osteócitos, uma vez que essas proteínas conseguem se ligar ao cálcio e assim evitar a mineralização dessas estruturas (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

Os osteócitos atuam também na regulação da homeostase do cálcio e fósforo. Essas células são capazes de produzir um hormônio denominado fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23), o qual é lançado na corrente sanguínea e age sobre as glândulas paratireóides diminuindo a secreção de PTH (BONEWALD, 2017). Os osteócitos desempenham importante papel na remodelação óssea uma vez que participam da detecção de áreas que necessitam de reparação e enviam sinais para orientar os osteoclastos (DUAN; BONEWALD, 2016). Quando os osteócitos sofrem apoptose eles servem como sinalizadores quimiotáticos para o recrutamento de osteoclastos locais (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

### **2.1.5 Remodelação óssea**

Os ossos, a fim de manter sua homeostase mineral e sua resistência, passam por um processo constante de renovação denominado remodelação. Através desse mecanismo, porções de tecido ósseo antigo ou danificado são reabsorvidas para em seguida serem substituídas por novas camadas de tecido mineralizado (CLARKE, 2008). Dessa forma, a ação conjunta de osteoclastos e osteoblastos mantém a massa e estrutura óssea (DELAISSE, et al., 2020).

A remodelação é um fenômeno fisiológico através do qual mantém-se a integridade estrutural e funcional do esqueleto (LOPES et al., 2018). Esse processo começa antes do nascimento e prossegue ao longo de toda a vida (CLARKE, 2008; DELAISSE, et al., 2020).

A remodelação fisiológica é um processo dinâmico orquestrado por complexas interações entre os diferentes tipos celulares que formam os ossos (LERNER; KINDSTEDT; LUNDBERG, 2019). A remodelação aumenta levemente nos homens idosos, enquanto que nas mulheres ela aumenta na perimenopausa e no começo da pós-menopausa. Contudo, a remodelação feminina diminui com o avanço da idade, ainda que em um ritmo mais acelerado em comparação às mulheres na pré-menopausa (CLARKE, 2008).

A remodelação é um fenômeno diferente da modelação, sendo essa um processo anabólico através do qual os ossos conseguem alterar sua forma para se ajustarem a influências

fisiológicas ou a forças mecânicas. A modelação é descrita pela lei de Wolff, segundo a qual os ossos longos adaptam seu tamanho, forma e densidade conforme o estresse ao qual são submetidos. Na modelação a ação de osteoblastos e osteoclastos não é acoplada como ocorre na remodelação (CLARKE, 2008).

O ciclo de remodelação fisiológica compreende cinco fases: iniciação ou ativação, reabsorção, reversão, formação e término (LERNER; KINDSTEDT; LUNDBERG, 2019). A fase de iniciação ocorre quando os osteócitos percebem áreas danificadas ou que sofreram estresse mecânico e conseqüentemente necessitam de remodelação. A partir de então, sinais são emitidos para recrutar células-tronco hematopoiéticas aos locais específicos e desencadear a osteoclastogênese, sendo seus principais iniciadores o M-CSF e o RANKL (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

No sítio a ser remodelado são agrupadas células da linhagem dos osteoblastos e precursores de osteoclastos para formar estruturas anatômicas temporárias especializadas em reabsorver e depositar tecido ósseo, as unidades básicas multicelulares (BMU) (SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016; LERNER; KINDSTEDT; LUNDBERG, 2019).

As BMU são cobertas por uma espécie de dossel (LERNER; KINDSTEDT; LUNDBERG, 2019) composto por células do revestimento ósseo formando assim o compartimento de reabsorção óssea (BRC) (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). As células que cobrem a superfície óssea mantêm contato com os BRC e também com os osteócitos dentro da matriz calcificada. Em osso trabecular, a BMU encontra-se na superfície óssea, sendo recoberta principalmente por células de origem mesenquimal (LERNER; KINDSTEDT; LUNDBERG, 2019).

Estando os osteoclastos maduros no sítio a ser remodelado, inicia-se a segunda fase do ciclo, isto é, a reabsorção óssea (LERNER; KINDSTEDT; LUNDBERG, 2019). Nessa etapa, os osteoclastos formam um microambiente isolado onde há liberação de íons hidrogênio que reduzem o pH a um valor próximo de 4,5 para solubilizar a hidroxiapatita (KATSIMBRI, 2017). Em seguida, ocorre a infiltração de enzimas proteolíticas para degradar a matriz (LERNER; KINDSTEDT; LUNDBERG, 2019).

Os osteoclastos enquanto realizam a reabsorção precisam inibir a formação óssea nas BMU e para isso secretam moléculas de Sema4D. Essas glicoproteínas pertencem à família das semaforinas e agem nos osteoblastos conectando-se aos seus receptores Plexin-B1 para assim bloquear a via do IGF-1 e impedir a sua diferenciação (SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016; LERNER; KINDSTEDT; LUNDBERG, 2019).

A reabsorção na lacuna de Howship dura aproximadamente duas a quatro semanas (KATSIMBRI, 2017). Passado esse tempo, a remodelação entra em uma fase de transição, a reversão, na qual os osteoclastos afastam-se da superfície óssea e entram em apoptose, enquanto monócitos, osteócitos e pré-osteoblastos são recrutados para a próxima etapa, a formação óssea (LERNER; KINDSTEDT; LUNDBERG, 2019).

Esse recrutamento é efetuado por sinais provenientes de osteócitos e por uma série de moléculas como fatores de crescimento liberados da matriz reabsorvida e produtos solúveis derivados das membranas de osteoclastos e pré-osteoclastos (LERNER; KINDSTEDT; LUNDBERG, 2019).

Após a cavidade óssea reabsorvida ter sido liberada, os pré-osteoblastos se diferenciam e preenchem seu espaço. No osso cortical, a BMU apresenta osteoclastos guiando uma zona de corte que é seguida por osteoblastos associados a inervação periférica e vasos sanguíneos compondo uma zona de vedação (LERNER; KINDSTEDT; LUNDBERG, 2019).

Os osteoblastos depositam majoritariamente colágeno tipo I para compor o osteóide (CLARKE, 2008; LERNER; KINDSTEDT; LUNDBERG, 2019). Os osteoblastos secretam as fibras de colágeno de maneira alternada formando uma estrutura semelhante a madeira compensada no osso lamelar, o que lhe confere grande resistência (CLARKE, 2008).

No tecido ósseo trabecular, em que as fibras colágenas são secretadas desordenadamente, a calcificação da matriz pode levar até 90 dias para seu término, ao passo que no osso cortical ela dura cerca de 130 dias (KATSIMBRI, 2017).

A fim de impedir novos ciclos de reabsorção, os osteoblastos liberam OPG para inibir a ligação do RANKL ao RANK nos pré-osteoclastos, bem como secretam a semaforina Sema3A para inibir a osteoclastogênese (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

Os osteócitos, pela ação da esclerostina, bloqueiam a sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina nos osteoblastos encerrando a formação de tecido mineralizado (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

A etapa de deposição óssea pode levar de quatro a seis meses para ser completada (KATSIMBRI, 2017), após a qual os osteoblastos sofrem apoptose ou se diferenciam em células do revestimento ósseo ou em osteócitos. Ao término da remodelação fisiológica, a mesma quantia de osso que foi reabsorvida é formada, sendo seu resultado a produção de novos ósteons (CLARKE, 2008).

Enquanto que na região periosteal há uma tendência para a formação óssea em relação a reabsorção, no endóstio e no osso trabecular ocorre o contrário, o que é evidenciado pelo estreitamento dessas regiões com o passar do tempo (KATSIMBRI, 2017).

O ciclo de remodelação óssea é regulado de maneira coordenada por uma série de hormônios e fatores locais e sistêmicos. Os principais hormônios envolvidos na regulação da reabsorção de tecido mineralizado são o estrogênio, a calcitonina, o PTH e a 1,25-dihidroxitamina D (SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016).

O estrogênio diminui as taxas de remodelação tanto em homens quanto em mulheres, modulando a atividade de osteoclastos e de osteoblastos ao mesmo tempo para inibir a reabsorção e manter os níveis de formação óssea (SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016). O estrogênio age de diferentes formas para reduzir a remodelação óssea. Ele inibe a diferenciação pela via do RANKL dos osteoclastos, estimula a síntese de OPG e suprime nos linfócitos T ativados a produção de TNF- $\alpha$  (KHOSLA; OURSLER; MONROE, 2012; SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016).

Nos osteoblastos, o estrogênio impede a apoptose, aumenta o tempo de atividade celular e diminui a expressão de RANKL. Ademais, esse hormônio modula a produção das citocinas IL-1, IL-6, M-CSF e prostaglandinas envolvidas na reabsorção óssea (SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016). A calcitonina, por sua vez age, em receptores presentes em osteoclastos e inibe a ação da membrana plegueada, além de reduzir a quantidade de osteoclastos (SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016).

## **2.2 PARÂMETROS DO METABOLISMO ÓSSEO**

O metabolismo ósseo pode ser acompanhado por meio de marcadores bioquímicos, isto é, substâncias que indicam a atividade de reabsorção e de formação do tecido mineral (VIEIRA, 1999). Os marcadores de formação óssea são produtos oriundos da atividade osteoblástica, enquanto que os marcadores de reabsorção são resultantes da ação dos osteoclastos na matriz óssea (VIEIRA, 1999; FANTASIA, 2009).

Os níveis dessas substâncias variam nos indivíduos conforme a idade, a atividade física, o ciclo menstrual e a presença de doenças ósseas ou renais. Na infância e adolescência, bem como durante a gravidez e a lactação, o metabolismo ósseo é elevado, o que reflete em níveis maiores de marcadores bioquímicos nesses períodos (VIEIRA, 1999).

Os principais marcadores da formação mineral são a fosfatase alcalina óssea sérica (FAO), a osteocalcina sérica, o pró-peptídeo do colágeno tipo I e a sialoproteína óssea (SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO 2002; FANTASIA, 2009). Os marcadores da reabsorção óssea mais comuns, séricos e urinários, são o telopeptídeo C-terminal do colágeno tipo I (CTX)



e o telopeptídeo N-terminal do colágeno tipo I (NTX), juntamente da deoxipiridinolina urinária (FANTASIA, 2009; GREENBLATT; TSAI; WEIN, 2017).

Existem ainda marcadores de reabsorção que não são específicos para o osso, isto é, são encontrados em outros tecidos do organismo, como a piridinolina e a hidroxiprolina urinárias e a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) sérica (FANTASIA, 2009; GREENBLATT; TSAI; WEIN, 2017). Outros indicadores séricos do metabolismo ósseo são o cálcio e o fósforo, o PTH e a 1,25-di-hidroxi-vitamina D (FANTASIA, 2009).

### 2.2.1 Cálcio

O cálcio é um mineral essencial imprescindível para a formação óssea, coagulação sanguínea, adesão celular, contração muscular, ativação de reações enzimáticas, liberação hormonal e de neurotransmissores, metabolismo do glicogênio e proliferação e diferenciação celular (PALACIOS et al., 2021).

O cálcio é o íon mais abundante no corpo (SUN et al., 2020). Quase a totalidade do cálcio corporal, isto é, cerca de 99%, encontra-se no tecido ósseo (CAMPOS; PINHATI, 2013), na forma de hidroxiapatita, isto é,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , sendo o quinto elemento mais abundante no organismo humano (PEACOCK, 2010).

O cálcio é obtido a partir de laticínios como leite, iogurte e queijo, bem como em cereais, nozes, sementes, couve, brócolis e agrião (CORMICK; BELIZÁN, 2019). A recomendação diária de ingestão de cálcio depende da idade, variando entre 1000 a 1500 mg (PEACOCK, 2010).

Além de formar e manter os tecidos ósseos, o cálcio atua na regulação de inúmeros processos orgânicos como um transmissor de sinais ou ativador de proteínas. Esse mineral está presente também nos meios intra e extracelulares, com cerca de 40% unido a proteínas carreadoras, como a albumina, não sendo filtrado pelo sistema renal (CAMPOS PINHATI, 2013; SUN et al., 2020).

É fundamental para a saúde que os níveis séricos de cálcio estejam regulados. Os níveis séricos de cálcio normalmente encontram-se entre 8.8 a 10.4 mg/dl (PEACOCK, 2010) em que aproximadamente 51% corresponde a íons livres, 40% ao cálcio ligado a proteínas (albumina) e 9% a complexos iônicos (VELDURTHY et al., 2016).

Aproximadamente 10% do cálcio extracelular circula como componentes solúveis combinados com diferentes ânions orgânicos. O restante do cálcio extracelular existe como um

ativo ionizado livre. A troca de cálcio entre os fluidos extracelulares e o tecido ósseo é uma parte dinâmica e essencial da remodelação óssea (SUN et al., 2020).

O valor normal de cálcio depende da quantidade de proteína disponível para formar complexos. No caso da albumina, a mais comum, a cada decréscimo de 1g da proteína sérica, estima-se que o cálcio no sangue decaia cerca de 0.8 mg (LOFRESE; BASIT; LAPPIN, 2019). O sistema digestivo absorve  $\text{Ca}^{2+}$  da alimentação mediante controle hormonal, sendo que boa parte desses íons não absorvidos é eliminada nas fezes (MOREIRA; DUARTE; FARIAS, 2004).

O equilíbrio de cálcio no organismo depende da relação entre os ossos, o trato gastrointestinal e os rins (CAMPOS; PINHATI, 2013). A homeostase do cálcio sérico mantém os níveis de cálcio ionizado extracelular em um intervalo fisiológico, ao mesmo tempo em que permite o fluxo desse mineral nos seus reservatórios (PEACOCK, 2010). O intestino é o principal órgão responsável pela absorção do cálcio (PU; CHEN; XUE, 2016).

### **2.2.2 Fósforo**

O fósforo é o segundo mineral mais abundante no corpo humano, representando 1% do peso corporal total (CALVO; LAMBERG-ALLARDT, 2015). Aproximadamente 80% do fósforo presente no organismo se encontra na forma de cristais de fosfato de cálcio,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (SERNA; BERGWITZ, 2020), conferindo dureza aos dentes e ossos, além de funcionar como a principal reserva de fósforo corporal (PEACOCK, 2020).

O fósforo é um mineral essencial (CHANG; ANDERSON, 2017) abundante na maioria dos alimentos, sendo absorvido quase duas vezes mais que o cálcio (PEACOCK, 2010), o que torna a deficiência de fósforo na dieta muito rara em seres humanos (VORLAND et al., 2017). O fósforo é encontrado principalmente no leite e seus derivados, mas também é obtido na carne vermelha, aves, peixes e grãos (CALVO; LAMBERG-ALLARDT, 2015; CHANG; ANDERSON, 2017).

Um adulto normal ingere na alimentação cerca de 1400 mg de fósforo. Destes, aproximadamente 900 mg são absorvidos. Estima-se que 200 mg de fósforo incorpora-se ao osso e uma quantia similar sai mediante os processos de formação e reabsorção óssea, respectivamente, com 900 mg sendo excretados na urina (PEACOCK, 2010).

A biodisponibilidade do fósforo varia conforme o tipo de alimento ingerido. Estima-se que leguminosas tenham a menor biodisponibilidade, cerca de 40%, e os aditivos de fósforo inorgânico tenham a maior biodisponibilidade, podendo alcançar até 100% (CHANG;

ANDERSON, 2017). Quando deficitário no organismo, podem-se desenvolver patologias como raquitismo e crescimento atrofiado em crianças, bem como osteomalácia em adultos (VORLAND et al., 2017).

A quantia total de fósforo no organismo adulto é estimada em 700g, com 85% correspondendo a hidroxiapatita, 14% presente em tecido mole e 1% nos espaços extracelulares (CHANG; ANDERSON, 2017). No entanto, existem estoques muito maiores de fósforo do que cálcio nos tecidos moles, o que indica o papel fundamental do fósforo no metabolismo energético e na estrutura e sinalização intracelular (PEACOCK, 2010).

Os níveis séricos do fósforo variam entre 2,5 e 4,5 mg/dl em indivíduos adultos saudáveis (CALVO; LAMBERG-ALLARDT, 2015). Os valores de fósforo sérico medidos refletem o fósforo circulando livremente como  $\text{HPO}_4$  ou  $\text{H}_2\text{PO}_4$ , o que significa apenas 15% da fração inorgânica, ou cerca de 465 mg (CHANG; ANDERSON, 2017). O fósforo intracelular corresponde a 14% do fósforo total do corpo, e cerca de 1% está presente nos fluidos extracelulares, principalmente como fosfato inorgânico (SERNA; BERGWITZ, 2020).

O fósforo é crítico para muitas atividades biológicas normais (SUN et al., 2020). Ele participa da contração muscular, da sinalização celular, na formação de membranas constituindo os fosfolipídios, está presente no DNA, RNA, ATP e também no fosfocreatina (SERNA; BERGWITZ, 2020; SUN et al., 2020). No tecido ósseo, o cálcio e o fósforo inorgânico, ou fosfato, atuam juntamente com osteoblastos, osteócitos e proteínas extracelulares para mineralizar o osteóide recém depositado (PEACOCK, 2010).

Quando os níveis séricos de fósforo diminuem, é ativada a enzima 1-alfa-hidroxilase nos rins para produzir  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  (calcitriol) que, em última instância, eleva a absorção de fósforo no intestino (SUN, M. et al., 2020). Apesar da homeostase do fósforo e do cálcio terem como semelhança a sua manutenção via trato gastrointestinal, sistema renal e reabsorção óssea (CHANG; ANDERSON, 2017), a resposta hormonal frente a uma variação sérica de fósforo é muito mais lenta e tolerada do que em relação às alterações no cálcio (PEACOCK, 2010).

### **2.2.3 Paratormônio (PTH)**

A homeostase do cálcio é regulada por dois hormônios principais que atuam em conjunto: o paratormônio (PTH) e a 1,25-di-hidroxitamina D (calcitriol) (PEACOCK, 2010; LOFRESE; BASIT; LAPPIN, 2019). O PTH é um hormônio polipeptídico considerado o principal regulador da homeostase do cálcio e do fósforo (POOLE; REEVE, 2005), atuando ativamente nos processos de remodelação óssea (BOVBJERG et al., 2021). O PTH é produzido

e secretado pelas quatro glândulas endócrinas paratireoides localizadas no pescoço, mais precisamente na porção posterior da tireóide (LOFRESE; BASIT; LAPPIN, 2019).

As glândulas paratireóides são formadas por dois tipos de células: as principais, encarregadas tanto da produção quanto da secreção do PTH, e as células oxifílicas, cuja função é desconhecida, porém sabe-se que sua quantidade diminui com o envelhecimento do indivíduo (LOFRESE; BASIT; LAPPIN, 2019).

As células das paratireóides são controladas pela concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  de uma maneira inversamente proporcional, ou seja, se ocorre um pequeno aumento nos níveis de cálcio, a secreção do PTH é inibida e eleva-se caso o  $\text{Ca}^{2+}$  sérico esteja em baixa. As paratireóides são ativas durante a gestação, regulando a homeostase do cálcio no feto (LOFRESE; BASIT; LAPPIN, 2019).

O PTH pode exercer tanto efeitos anabólicos quanto catabólicos no tecido ósseo (SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016). Altas concentrações de PTH por um período contínuo facilitam a reabsorção óssea, enquanto que baixas doses de modo intermitente promovem a formação mineral (POOLE; REEVE, 2005; SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016).

Muitas funções do PTH são realizadas também pelo peptídeo relacionado ao paratormônio (PTHrP), ou teriparatida, PTH (34-1) (BOVBJERG et al., 2021), o qual apresenta em sua estrutura homologia de aproximadamente 70% com o PTH (SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016). A teriparatida foi aprovada como tratamento médico para osteoporose e foi comprovado que reduz o risco de fraturas não traumáticas (BOVBJERG et al., 2021).

O PTH compensa a queda do cálcio extracelular através de três formas: agindo diretamente nos ossos e rins e indiretamente no trato gastrointestinal (SILVA; BILEZIKIAN, 2015). A primeira ação do PTH ocorre nos osteoblastos para influenciar indiretamente a formação de osteoclastos (LOFRESE; BASIT; LAPPIN, 2019).

O PTH se conecta a receptores nos osteoblastos induzindo-os a liberar RANKL, que por sua vez estimula a maturação dos osteoclastos para reabsorver a matriz óssea e assim conceder cálcio e fosfato para o líquido extracelular (LOFRESE; BASIT; LAPPIN, 2019). Para favorecer a reabsorção óssea, o PTH também inibe a expressão de OPG e reduz a atividade de osteoblastos (POOLE; REEVE, 2005; SILVA; BILEZIKIAN, 2015).

A segunda ação do PTH para equilibrar a diminuição sérica de cálcio ocorre nos rins (LOFRESE; BASIT; LAPPIN, 2019). Os rins são os principais órgãos reguladores da homeostase do cálcio e do fósforo (PEACOCK, 2010). O papel dos rins no controle dos níveis de cálcio consiste em reabsorver os íons do sangue filtrado conforme a demanda no organismo, ou seja, quando o  $\text{Ca}^{2+}$  plasmático está baixo, aumenta-se a sua reabsorção nos túbulos renais e

diminui-se a eliminação na urina. (LOFRESE; BASIT; LAPPIN, 2019). O cálcio é absorvido nos néfrons, sendo que a maior absorção ocorre nos túbulos proximais (PU; CHEN; XUE, 2016).

Nos rins, por meio da regulação do transportador de cálcio TRPV5 no epitélio tubular, o PTH estimula a reabsorção de  $\text{Ca}^{2+}$  reduzindo sua excreção na alça de Henle e nos túbulos distais. Nos túbulos proximais e distais, o PTH reduz a reabsorção de fósforo, uma vez que o fósforo tende a formar complexos com o  $\text{Ca}^{2+}$ , o que diminuiria a disponibilidade de cálcio livre (LOFRESE; BASIT; LAPPIN, 2019).

O PTH também regula a enzima 1-alfa-hidroxilase a qual estimula a produção renal da forma biologicamente ativa da 1,25-di-hidroxivitamina, ou calcitriol (LOFRESE; BASIT; LAPPIN, 2019). A reabsorção de cálcio no rim é modulada também pelo estrogênio (PU; CHEN; XUE, 2016).

A terceira ação do PTH ocorre no intestino delgado de forma indireta. No epitélio intestinal, há um aumento na transcrição e tradução de proteínas transportadoras de cálcio, isto é, TRPV6, bombas de cálcio dependentes de ATP e calbindina (LOFRESE; BASIT; LAPPIN, 2019). Esse transporte ativo é responsável pela maior parte da absorção de cálcio e é controlado pelo calcitriol,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , enquanto que cerca de 8 a 23% do total da absorção de cálcio no intestino é efetuada por difusão passiva. Com isso, aproximadamente 30% do cálcio ingerido em um adulto saudável é absorvido pelo intestino delgado (PEACOCK, 2010).

O calcitriol é a forma mais ativa da vitamina D3, tendo papel crítico no organismo promovendo o crescimento ósseo, melhorando a resposta neuromuscular e mantendo o equilíbrio de cálcio e fósforo (SAMIEI et al., 2021). O calcitriol obtido sob o estímulo do PTH aumenta a absorção de cálcio no duodeno e favorece a retenção do fósforo no jejuno e no íleo (MOREIRA; DUARTE; FARIAS, 2004). O calcitriol é produzido inicialmente no fígado, o seu principal regulador, e depois pelos rins, tendo como objetivo estimular a absorção do  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  no intestino delgado (MOREIRA; DUARTE; FARIAS, 2004; LOFRESE; BASIT; LAPPIN, 2019).

Por outro lado, o PTH e o PTHrP quando administrados de forma intermitente e em baixas doses promovem a formação óssea, sendo empregados no tratamento da osteoporose. A reabsorção óssea na dose intermitente do PTH também ocorre, porém após a “janela anabólica”, isto é, o período inicial da ação do paratormônio em que há formação óssea sem reabsorção. Mesmo após a janela anabólica, quando a remodelação óssea é estimulada, a formação predomina sobre a reabsorção (SILVA; BILEZIKIAN, 2015).

O paratormônio aumenta o número de osteoblastos de diferentes formas. O PTH bloqueia a apoptose dos osteoblastos e ativa as células do revestimento ósseo para que se diferenciem novamente em osteoblastos (SILVA; BILEZIKIAN, 2015). Nos osteócitos, o PTH diminui os níveis da glicoproteína esclerostina, uma inibidora da formação óssea (SILVA; BILEZIKIAN, 2015; WEIN; KRONENBERG, 2018).

Ademais, com a indução da reabsorção óssea pelo PTH, conforme os osteoclastos dissolvem a matriz são liberados fatores de crescimento os quais, por sua vez, recrutam e diferenciam pré-osteoblastos na superfície óssea (WEIN; KRONENBERG, 2018).

A vitamina D está envolvida de maneira crucial na absorção não somente do cálcio da dieta, mas também de fosfato, magnésio, zinco e ferro (SAMIEI et al., 2021). Sua principal fonte é a radiação solar ultravioleta B (NAKAMURA et al., 2019). A maior porcentagem de vitamina D no corpo humano é oriunda da transformação de 7-deidrocolesterol, isto é, a pró-vitamina D, em pré-vitamina D na pele, enquanto que o restante é obtido a partir da alimentação (MOREIRA; DUARTE; FARIAS, 2004).

Nos ossos, juntamente com o PTH, pelo estímulo à osteoclastogênese, a 1,25-dihidroxitamina mobiliza cálcio e fósforo dos tecidos mineralizados e, nos osteoblastos maduros, o calcitriol eleva a expressão de FA, osteocalcina e osteopontina (MOREIRA; DUARTE; FARIAS, 2004). Quando há deficiência da vitamina D no organismo, observa-se um aumento nos níveis de PTH a fim de recrutar cálcio do esqueleto (DRETAKIS; IGOUMENOU, 2019).

Contudo, em concentrações elevadas, o PTH torna-se uma toxina urêmica e influencia na perda mineral nos ossos, podendo gerar calcificação de vasos e válvulas, anemia, cardiomiopatia e hipertensão (JAQUETO et al., 2016). Nos idosos, há uma inadequada absorção intestinal de cálcio combinada com um declínio hormonal relativo à idade que resulta em efeitos adversos na saúde óssea (VELDURTHY et al., 2016).

#### **2.2.4 Fosfatase alcalina (FA)**

Além da concentração de cálcio e fósforo no organismo, a calcificação também depende da ação da enzima fosfatase alcalina (FA) e de inúmeras outras proteínas não colagenosas (CLARKE, 2008). A FA é uma proteína glicosilada contendo zinco, com um peso molecular tipicamente entre 70.000 e 180.000 Da (HAN et al., 2020), composta por várias isoenzimas (VIMALRAJ, 2020). A FA é uma ectoenzima (FISHER et al., 2007) ou encontrada livre na

matriz calcificada ou presente na membrana de osteoblastos através de uma ligação de fosfoinositol. A FA tem meia vida biológica de aproximadamente 1,6 dias (VIEIRA, 1999).

A FA foi descoberta em 1923 (MILLÁN, 2016) e desempenha um papel fundamental na mineralização dos ossos, uma vez que está associada a casos de hipofosfatasia, uma doença metabólica hereditária rara causada por uma mutação no gene ALPL (BRICHACEK; BROWN, 2019). A FA atua na mineralização do osteóide de três formas (CLARKE, 2008).

A primeira forma é através da clivagem do pirofosfato inorgânico, o que gera o aumento da concentração tecidual de fósforo (CLARKE, 2008), um ativador da calcificação. A segunda forma é a própria quebra do pirofosfato inibidor, que diminui sua concentração (MURSHED, 2018). A terceira ação da FA é alterar fosfoproteínas para que atuem como promotores da mineralização óssea (CLARKE, 2008).

A FA total é a soma das isoformas de FA existentes no soro, não sendo um marcador específico tecidual, uma vez que a FA pode ser principalmente de origem hepática ou óssea (BIKLE, 1997; SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002). A FA específica do osso (FAO) corresponde a cerca de 40 a 50% dos níveis de FA em adultos saudáveis (HEINRICH et al., 2018).

Os níveis séricos normais de FA variam dependendo do sexo e da idade (BRICHACEK; BROWN, 2019). O intervalo médio de FA sérica de adultos saudáveis varia de 40 a 150 U/L (HAN et al., 2020). Tendo em vista que os níveis de FAO aumentam quando há proliferação de osteoblastos (HEINRICH et al., 2018), valores naturalmente altos de FA são vistos em crianças, uma vez que seus ossos ainda estão crescendo.

A gestação também pode elevar a FA sérica 2 a 3 vezes em relação ao normal devido a um aumento na FA da placenta (BRICHACEK; BROWN, 2019). Uma elevação nos valores de referência da FAO pode representar também um processo de regeneração nos tecidos ósseos, como no caso de fraturas (SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002).

Níveis séricos elevados de FA estão associados a patologias como obstrução biliar, resposta à leucemia, linfoma, tumores ósseos osteoblásticos, osteomalácia, diabetes (HAN et al., 2020), mineralização esquelética excessiva, doença de Paget e Alzheimer (BRICHACEK; BROWN, 2019). Já valores sanguíneos reduzidos de FA são encontrados principalmente em casos de doença de Wilson e leucemia (HAN et al., 2020).

## 2.3 DISTÚRBIOS DO METABOLISMO ÓSSEO

O metabolismo ósseo é um mecanismo fisiológico dependente do equilíbrio entre a atividade de osteoblastos e osteoclastos (AMADEI et al, 2006; COMPSTON; McCLUNG; LESLIE, 2019). Quando essa relação harmônica é perturbada, seja por alterações hormonais, seja por desbalanço das citocinas inflamatórias, são desencadeados processos que direcionam à perda ou à formação patológica de tecido ósseo (SINGH; BRAY; HALL-CRAGGS, 2018).

A osteoporose é uma doença óssea sistêmica caracterizada pela diminuição da densidade mineral e qualidade dos ossos, o que ocasiona uma deterioração microestrutural que torna os ossos menos resistentes e mais suscetíveis a fraturas (COMPSTON; McCLUNG; LESLIE, 2019; LI et al, 2021).

A osteoporose é consequência de um desequilíbrio nos processos de reabsorção e formação de tecido mineralizado (AMADEI et al, 2006), onde a formação óssea dos osteoblastos é incapaz de compensar a reabsorção óssea dos osteoclastos (ZHAO et al., 2021). Consequentemente, ocorre perda de massa óssea, apesar da concentração de cálcio na matriz orgânica se manter normal (AMADEI et al, 2006), podendo afetar qualquer osso do organismo (COMPSTON; McCLUNG; LESLIE, 2019).

Calcula-se que 200 milhões de indivíduos sejam afetados pela osteoporose no mundo todo (NGUYEN; BOUIN; STE-MARIE, 2021). A osteoporose atinge tanto homens quanto mulheres, sendo mais prevalente na pós-menopausa, período no qual a queda dos níveis de estrogênio acelera a reabsorção óssea (AMADEI et al, 2006).

Tendo em vista que a densidade óssea em média aumenta até os 30 anos nos indivíduos e sofre um decréscimo a partir dessa idade, os idosos são mais suscetíveis ao desenvolvimento da osteoporose (FRAZÃO; NAVEIRA, 2006). O diagnóstico da osteoporose é confirmado quando a densidade mineral óssea (BMD) encontra-se 2.5 ou mais abaixo da média de um adulto jovem (COMPSTON; McCLUNG; LESLIE, 2019).

A doença de Paget, conhecida também como osteíte deformante, é a segunda patologia do metabolismo ósseo mais comum depois da osteoporose (TUCK, 2020). Sua patogênese não está completamente elucidada, mas sabe-se que predisposição genética e infecção viral contribuem para o seu desenvolvimento (VALENZUELA; PIETSCHMANN, 2016).

Na doença de Paget, ocorre intensa e descontrolada remodelação óssea resultando em ossos fragilizados e suscetíveis a deformações (VALENZUELA; PIETSCHMANN, 2016). Os osteoclastos são hiperativos, apresentando partículas virais em sua estrutura, possivelmente de um vírus da família paramyxoviridae (JOSÉ; PERNAMBUCO; DO AMARAL, 2008).



A reabsorção localizada é seguida por uma ação compensatória de osteoblastos que depositam tecido mineralizado de forma desorganizada. O osso assim remodelado possui um padrão em mosaico acompanhado por fibrose (JOSÉ; PERNAMBUCO; DO AMARAL, 2008). A doença de Paget pode acometer qualquer osso do esqueleto (VALENZUELA; PIETSCHMANN, 2016) e suas complicações são inúmeras, dentre as quais dor óssea, prejuízos estéticos, paralisia facial, neuralgia trigeminal, perda auditiva neurosensorial, hipercalcemia, transformações malignas e danos cardiovasculares (JOSÉ; PERNAMBUCO; DO AMARAL, 2008).

O metabolismo ósseo também é perturbado em casos de mieloma múltiplo. O mieloma múltiplo é uma neoplasia maligna dos linfócitos B em que os plasmócitos multiplicam-se de forma desregulada na medula óssea (SILVA et al., 2009; PADALA et al., 2021). O mieloma múltiplo afeta 7 em cada 100.000 adultos com média de idade de 65 anos (OZYURTSEVEN et al., 2021).

A sua principal complicação é a destruição de tecido ósseo devido ao desequilíbrio nos processos de remodelação, o que pode ocasionar quadros de hipercalcemia. A interação dos plasmócitos com o microambiente medular aumenta a ativação de osteoclastos que por sua vez intensificam a reabsorção óssea. A formação de tecido mineralizado pelos osteoblastos, contudo, não acompanha esse processo ocasionando a perda óssea (HUNGRIA, 2007).

Uma opção amplamente empregada no tratamento dessas patologias do metabolismo ósseo são medicamentos antirreabsortivos, sendo os principais os bisfosfonatos e o denosumab (CAIRES et al., 2017).

## **2.4 MEDICAMENTOS ANTIRREABSORTIVOS**

### **2.4.1 Bisfosfonatos**

Os bisfosfonatos (BFs) são um grupo de medicamentos amplamente empregados no tratamento de doenças ósseas metabólicas como a osteoporose (HAYES et al., 2021), a doença de Paget e a hipercalcemia decorrente de tumores malignos, como em casos de mieloma múltiplo e câncer de mama (RUGGIERO; FANTASIA; CARLSON, 2006; LECHNER; VON BAEHR; ZIMMERMANN, 2021).

As moléculas dos BFs incorporam-se ao tecido ósseo e, ao serem internalizadas pelos osteoclastos durante a reabsorção, provocam inúmeras alterações intracelulares que culminam

na apoptose das células reabsortivas (CONSOLARO; CONSOLARO, 2008). Com a redução do número de osteoclastos, aumenta-se a densidade mineral e a resistência a fraturas (PASSÉRI et al., 2011).

Os BFs foram produzidos pela primeira vez em 1865 na Alemanha, por Menschutkin, e foram empregados em fins industriais como anticorrosivos, em tubulações para evitar o acúmulo de carbonato de cálcio e em lavanderias como amaciantes. Posteriormente descobriu-se sua capacidade de dissolver e controlar a formação de fosfato de cálcio, mas foi só a partir da década de 60, com o suíço Fleisch e seus colaboradores, que o emprego terapêutico dos BFs foi impulsionado (SOUZA, 2010).

O BF é um análogo sintético do pirofosfato inorgânico (PPi) (JESUS et al., 2019), um produto do metabolismo normal (Figura 1) (GEGLER et al., 2006). O PPi é um regulador fisiológico da calcificação, responsável por impedir mineralizações ectópicas nas artérias, pele e diversos outros locais do organismo (CONSOLARO; CONSOLARO, 2008).

Contudo, do ponto de vista terapêutico, o PPi não é capaz de evitar a reabsorção óssea devido à sua inatividade quando aplicado por via oral e pela sua rápida hidrólise quando administrado via parenteral. Sendo assim, foram desenvolvidos análogos do PPi que fossem resistentes à ação de enzimas, mas que preservassem suas propriedades antidesmineralizantes (CONSOLARO; CONSOLARO, 2008).

Isso foi alcançado através da substituição das ligações instáveis fósforo-oxigênio-fósforo do PPi por fósforo-carbono-fósforo nos BFs (RUSSELL et al., 2008). Essa substituição de um átomo de oxigênio por outro de carbono permitiu o acréscimo de duas cadeias laterais (WIDLER et al., 2002), o que tornou o bisfosfonato uma molécula estável, resistente à hidrólise (ORYAN; SAHVIEH, 2021) e que não sofre conversão em metabólitos, sendo excretada do organismo sem alterações (RUSSELL et al., 2008).

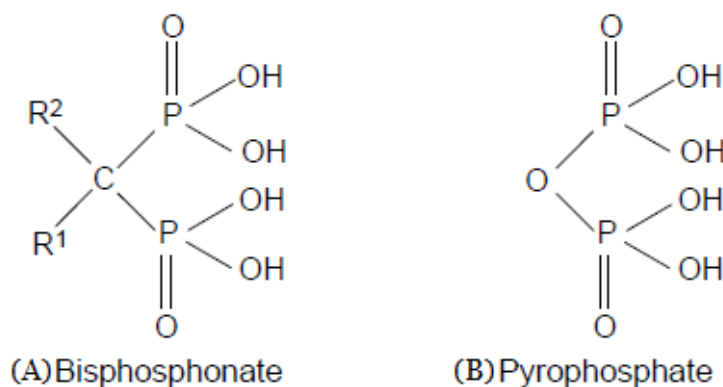


Figura 1 – Bisfosfonato (A) e Pirofosfato (B) (Adaptação de HEYMANN, 2004)

A estrutura química dos BFs clinicamente relevantes é composta de dois grupos fosfato ( $\text{PO}_3$ ) conectados covalentemente a um átomo central de carbono, juntamente de uma cadeia curta denominada  $R_1$ , e outra longa  $R_2$ , cujos constituintes variam de um medicamento para outro (YANG et al., 2019). Os dois grupos fosfatos são necessários tanto para a conexão da molécula ao tecido ósseo quanto para mediar a ação antirreabsortiva nos osteoclastos (RUSSELL et al., 2008).

A cadeia curta  $R_1$  corresponde a um grupo hidroxila (OH) (WIDLER et al., 2002), responsável pelas propriedades farmacocinéticas do BF. O grupo OH, juntamente da porção fósforo-carbono-fósforo de sua cadeia, confere alta afinidade aos cristais de hidroxiapatita óssea (JUNIOR; CASADO; BARBOZA, 2007).

A cadeia longa  $R_2$ , por sua vez, é a responsável pela potência antirreabsortiva (WIDLER et al., 2002) e pelo mecanismo farmacológico do medicamento (JUNIOR; CASADO; BARBOZA, 2007). Os BFs no organismo têm dois comportamentos biológicos: inibem a reabsorção óssea ou, quando em altas doses, conseguem modular a calcificação (RUSSELL et al., 1999). As moléculas de BFs são incorporadas aos osteoclastos quando o tecido ósseo é reabsorvido durante a remodelação óssea. Uma vez no interior dos osteoclastos, os BFs induzem a apoptose inibindo assim a reabsorção óssea (YANG et al., 2019).

Os BFs são administrados por via oral ou intravenosa, com boa parte da dose sendo incorporada aos ossos (GEGLER et al., 2006) e a restante eliminada de forma inalterada pelos rins dentro de 48-72 horas (THERIAULT, 2003). A administração oral é indicada para o tratamento da osteoporose, osteopenia, doença de Paget e osteogênese imperfeita (LOPES et al., 2009).

Os medicamentos intravenosos são recomendados para tratar complicações decorrentes de neoplasias malignas ósseas, como hipercalcemia, metástases de tumores sólidos de mama, pulmão e próstata, além do mieloma múltiplo e da doença de Paget (THERIAULT, 2003; LOPES et al., 2009; PASSÉRI et al., 2011).

Pelo trato gastrointestinal, a absorção dos BFs é pequena e pode ser prejudicada pela alimentação. Cerca de 1 a 10% da dose oral é biodisponível e, uma vez na circulação, os BFs têm meia-vida curta, aproximadamente 0.5-2.0 horas no ser humano (THERIAULT, 2003).

Os BFs são classificados quanto a presença ou não de nitrogênio na composição da sua cadeia  $R_2$  em não nitrogenados e nitrogenados (ORYAN; SAHVIEH, 2021). Os BFs são organizados cronologicamente em três gerações de fármacos (HEYMANN et al., 2004), em que a potência antirreabsortiva aumenta cerca de dez vezes de uma geração para outra (GEGLER et al., 2006).

### 2.4.1.1 Bisfosfonatos da primeira geração

A primeira geração de bisfosfonatos, inicialmente denominados difosfonatos (WIDLER et al., 2002), originou-se na década de 1960, com o advento do ácido clodronico, de uso oral ou intravenoso, e do etidronato, de administração oral (Figura 2) (MALWAL et al., 2018; HOLSTEIN, 2019).

O etidronato foi o primeiro bisfosfonato de uso clínico indicado para o tratamento da doença de Paget e da ossificação heterotópica (HOLSTEIN, 2019). Em 1995, os bisfosfonatos da primeira geração foram liberados para o tratamento da osteoporose (WAN et al., 2020). Posteriormente foi desenvolvido o tiludronato (Figura 2), apresentando um anel aromático em sua estrutura (HEYMANN et al., 2004).

Os BFs da primeira geração contêm uma curta cadeia R<sub>2</sub> com um grupamento alquila, haleto ou hidroxila (WIDLER et al., 2002). Como são prontamente metabolizados pelos osteoclastos, os BFs da primeira geração têm baixa capacidade antirreabsortiva (WIDLER et al., 2002). In vitro, se estabelecido o valor de 1 para a potência antirreabsortiva do etidronato, o ácido clodronico apresenta potência relativa de 10 (HEYMANN et al., 2004).

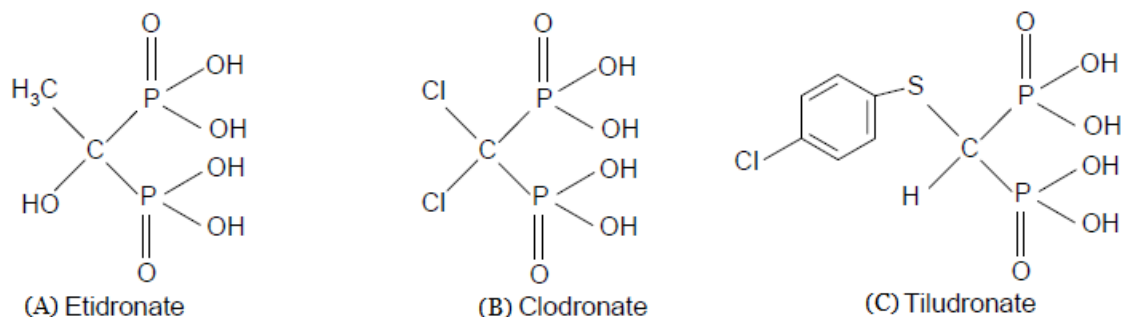


Figura 2 – Etidronato (A), ácido clodronico (B) e tiludronato (C) (Adaptação de HEYMANN, 2004)

O mecanismo de ação pelo qual os BFs não nitrogenados geram a apoptose dos osteoclastos é diferente do processo realizado pelos BFs nitrogenados (YANG et al., 2019). Os BFs da primeira geração são absorvidos pelos osteoclastos durante o processo de reabsorção óssea e produzem análogos citotóxicos da adenosina trifosfato (ATP) (RUSSELL et al., 2008).

Os osteoclastos contêm um número elevado de mitocôndrias e dependem da síntese de muitas moléculas de ATP para suas atividades de reabsorção (RUSSELL et al., 2008). Os BFs não nitrogenados são metabolizados pelos osteoclastos gerando os análogos ApppI (éster isopenentínico do ATP) ou AppCCl<sub>2</sub>p (Clodronato de AMP) (MALWAL et al., 2018).

O acúmulo desses metabólitos no meio intracelular inibe a translocase de nucleotídeo de adenina (ANT) presente na membrana das mitocôndrias (MALWAL et al., 2018). Com isso, as enzimas caspases são ativadas e a permeabilidade da membrana mitocondrial é afetada, o que conduz inevitavelmente o osteoclasto à apoptose (RUSSELL et al., 2008).

#### 2.4.1.2 Bisfosfonatos da segunda geração

A segunda geração de BFs foi inaugurada com o advento do pamidronato e, mais tarde, foi acrescida do alendronato de sódio (AL) (Figura 3). A estrutura do pamidronato contém um grupo amino-alkila em sua cadeia R<sub>2</sub>, juntamente de um átomo de nitrogênio (WIDLER et al., 2002).

O pamidronato foi o primeiro bisfosfonato a conter nitrogênio (WIDLER et al., 2002), um elemento que contribui para dificultar a metabolização do fármaco, prolongando assim sua ação no organismo (PASSÉRI et al., 2011). Pelo fato de ser mais potente em inibir a reabsorção óssea e mais tolerável que os medicamentos da primeira geração, o pamidronato foi amplamente empregado no tratamento da hipercalcemia associada à malignidade, da doença de Paget, das metástases ósseas em câncer de mama e do mieloma múltiplo (WIDLER et al., 2002).

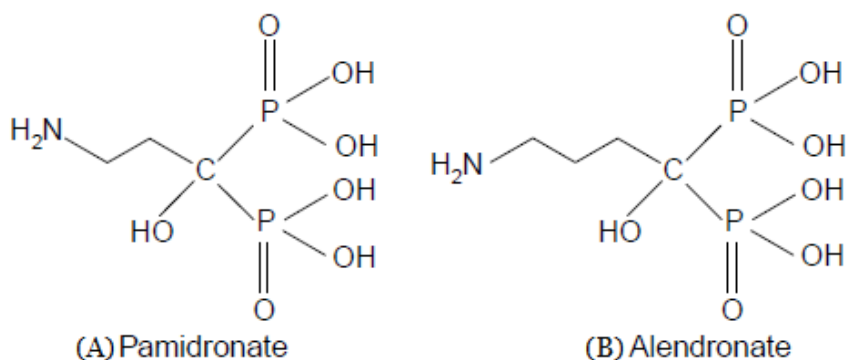


Figura 3 - Pamidronato (A) e alendronato (B) (Adaptação de HEYMANN, 2004)

O AL é um bisfosfonato nitrogenado que possui em sua cadeia R<sub>2</sub> um átomo de carbono a mais que o pamidronato (HEYMANN et al., 2004), sendo indicado para o tratamento da osteoporose em homens e mulheres na pós-menopausa, bem como para o controle da doença de Paget e da hipercalcemia maligna (RIBEIRO; VOLPATO, 2005; OH et al., 2015).

O AL é um fármaco de administração oral. Contudo, sua biodisponibilidade por essa via é baixa, cerca de 0,4 a 0,7% (RIBEIRO; VOLPATO, 2005), possivelmente por ter

moléculas altamente carregadas com propensão a formar sais insolúveis ao interagir com cátions polivalentes, como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+3}$  (GERTZ et al. 1995). Sendo assim, o alendronato não pode ser ingerido simultaneamente a alimentos como leite, café e suco de laranja, pois teria sua absorção pelo organismo prejudicada, devendo, portanto, ser administrado com água em jejum (GERTZ et al. 1995). Uma vez na corrente sanguínea, aproximadamente 40-60% da dose do AL liga-se exclusivamente ao tecido ósseo, com o restante sendo excretado via renal (OLSZYNSKI; DAVISON, 2008). Os BFs que não se ligam aos ossos são excretados sem sofrer metabolização (HOLSTEIN, 2019).

O alendronato incorpora-se ao tecido mineralizado de tal forma que só é liberado mediante outro ciclo de remodelação (OLSZYNSKI; DAVISON, 2008). Dessa forma, conforme o bisfosfonato se dissocia lentamente da hidroxiapatita, ele continua suprimindo a remodelação óssea, mesmo após a descontinuação da terapia (HAYES et al., 2021). A meia vida de eliminação do AL pode chegar até dez anos no ser humano (LECHNER; VON BAEHR; ZIMMERMANN, 2021).

O mecanismo de ação do AL e dos BFs nitrogenados de uma maneira geral é provocar a apoptose dos osteoclastos através da interrupção da via do mevalonato, uma via metabólica fundamental para a produção de esteróides como o colesterol (WAN et al., 2020), atenuando assim a perda óssea e reduzindo a incidência de fraturas (ZHAO et al., 2021).

No processo de reabsorção de um osso contendo AL, o osteoclasto forma um microambiente no qual o pH ácido oriundo de prótons (VASCONCELLOS; DUARTE; MAIA, 2004) gera a dissociação das moléculas de BFs dos cristais de hidroxiapatita (RUSSEL et al., 2008). Os BFs, então, em complexos com cálcio e proteínas da matriz orgânica óssea, são absorvidos via endocitose para o meio intracelular do osteoclasto, no qual passam para o interior de vesículas e, mediante a acidificação dessas estruturas, são transferidos ao citosol (RUSSEL et al., 2008). A partir do citoplasma, os BFs alcançam os peroxissomos para inibir sua enzima farnesil pirofosfato sintase (FPPS) (RUSSEL et al., 2008; HAYES et al., 2021).

A enzima FPPS faz parte da via do mevalonato, sendo o principal alvo de todos os BFs nitrogenados de uso clínico, com sua inibição gerando inúmeras alterações que culminam na apoptose do osteoclasto (RUSSEL et al., 2008; ORYAN; SAHVIEH, 2021). As FPPS utilizam como substrato difosfatos isoprenóides para sintetizar o intermediário farnesil pirofosfato (FPP), o qual é necessário para produzir a proteína geranylgeranyl difosfato (GGPP) através da enzima GGPP sintase. Os metabólitos isoprenóides GGPP e FPP, por sua vez, são requeridos para a prenilação das pequenas proteínas GTPases (RUSSEL et al., 2008).

Essas proteínas sinalizadoras são fundamentais nos osteoclastos para o tráfego de vesículas (VASCONCELLOS; DUARTE; MAIA, 2004) para o funcionamento adequado da membrana pregueada e para a preservação do citoesqueleto (RUSSELL et al., 1999).

A prenilação consiste na modificação de uma proteína que é acrescida ou por um isoprenóide farnesil, isto é, um lipídio com 15 carbonos, ou por um isoprenóide geranylgeranyl, ou seja, um lipídio com 20 carbonos (PALSULEDESAI e DISTEFANO, 2014).

A ligação de um grupo geranylgeranyl à proteínas-G regulatórias como Rac, Rho, Cdc-42 e membros da família Rab, é fundamental para a atividade dessas proteínas, uma vez que serve para ancorá-las ou na membrana plasmática ou em membranas intracelulares, além de possivelmente auxiliar nas interações entre proteínas (VASCONCELLOS; DUARTE; MAIA, 2004).

Os BFs nitrogenados, portanto, agem como análogos dos difosfatos isoprenóides e inibem a FPPS, o que previne a geranylgeranilação das GTPases (RUSSELL et al., 2008).

Desse modo, há o acúmulo intracelular de GTPases não prenilizadas as quais ativam equivocadamente outras vias de sinalização que afetam o funcionamento normal do osteoclasto, gerando a perda da membrana pregueada, alterações no citoesqueleto e nas bombas de prótons H<sup>+</sup>-ATPase (RUSSELL et al., 1999) e, em última instância, provocam a apoptose do osteoclasto (RUSSELL et al., 2008).

Diferentemente do etidronato da primeira geração, o AL não impede a mineralização óssea, mas sim a sua reabsorção, o que diminui consideravelmente o risco de o paciente desenvolver osteomalácia durante o tratamento (RIBEIRO; VOLPATO, 2005). Além do pamidronato dissódico e do AL, a segunda geração contém também o ibandronato (JUNIOR; CASADO; BARBOZA, 2007) (Figura 4), o qual apresenta em sua cadeia R<sub>2</sub> a porção CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>) mais um grupo pentil (HEYMANN et al., 2004).

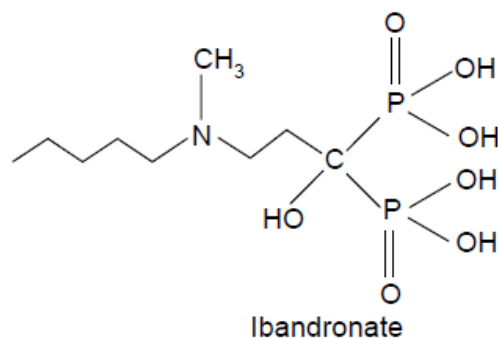


Figura 4 - Ibandronato (Adaptação de HEYMANN, 2004)

### 2.4.1.3 Bisfosfonatos da terceira geração

A terceira geração dos BFs apresenta anéis heterocíclicos com um ou mais átomos de nitrogênio na composição da cadeia R<sub>2</sub> ligada à porção fósforo-carbono-fósforo. Os principais representantes da terceira geração são o risedronato de sódio, com um átomo de nitrogênio em seu anel piridil e o ácido zoledrônico (ZL), com dois átomos de nitrogênio em seu anel imidazol (Figura 5) (HEYMANN et al., 2004). Quando comparado in vitro ao alendronato, ibandronato e risedronato, o ZL possui a maior atração pela hidroxiapatita (FINIANOS; ARAGON-CHING, 2019). Quanto à potência antirreabsortiva, o ZL é 850 vezes mais potente que o pamidronato da segunda geração (BOWDEN; MAHAN, 2017).

Tomando-se como referência a potência relativa de 1 para o etidronato da primeira geração, o risedronato apresenta potência entre 1.000 a 10.000 e o ZL uma força antirreabsortiva acima de 10.000 (HEYMANN et al., 2004). Além de inibir a reabsorção do tecido mineralizado pelos osteoclastos, o ZL estimula a diferenciação de osteoblastos, contribuindo assim para o aumento da densidade óssea. O ZL consegue elevar a massa óssea trabecular 150 vezes mais que o pamidronato (BOWDEN; MAHAN, 2017).

O ZL é o principal medicamento empregado no tratamento da hipercalcemia associada ao câncer e das metástases ósseas de tumores de mama, pulmão e próstata (KOLPAKOVA et al., 2016).

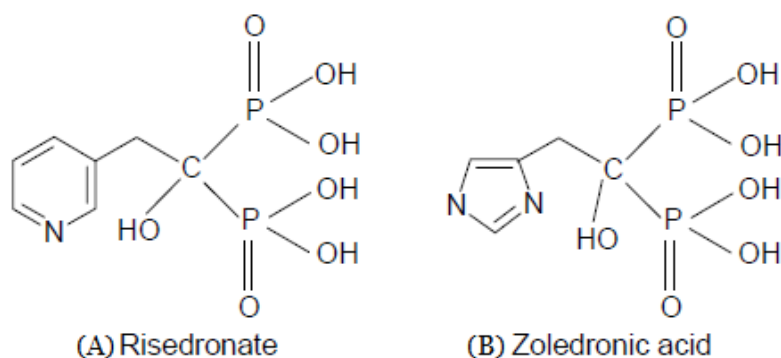


Figura 5 – Risedronato (A) e Ácido Zoledrônico (B) (Adaptação de HEYMANN, 2004)

A administração do ZL ocorre por via endovenosa, geralmente uma vez ao ano (SOUZA, 2010) em uma dose de 4-5 mg (GRIZ; BANDEIRA, 2006). Após 24h da aplicação, a concentração sérica do ZL é reduzida a menos de 1%. Aproximadamente 55% da dose é então incorporada ao tecido ósseo, enquanto que os 45% restantes são eliminados sem alterações na



urina (BOWDEN; MAHAN, 2017). Tendo em vista que os rins são os principais responsáveis pela excreção do ZL, esse bisfosfonato não é indicado para pacientes com insuficiência renal aguda ou com depuração de creatina menor que 30 mL/min (GRIZ; BANDEIRA, 2006).

Além da ação antirreabsortiva, os BFs apresentam efeitos antitumorais diretos e indiretos que variam de acordo com a estrutura molecular do fármaco, com os BFs nitrogenados sendo superiores em relação aos BFs da primeira geração (HEYMANN et al., 2004).

Os BFs conseguem alterar o microambiente ósseo ao redor de células cancerosas, o que pode prejudicar a sobrevivência das mesmas e a recorrência da doença (LECHNER; VON BAEHR; ZIMMERMANN, 2021). Os BFs agem diretamente sobre as células tumorais interrompendo sua adesão ao tecido ósseo no processo de metástase. Através da inibição da prenilação das pequenas GTPases, os fármacos nitrogenados impedem a ativação das integrinas responsáveis pela fixação celular (CLÉZARDIN; EBETINO; FOURNIER, 2005).

Por meio do bloqueio da atividade proteolítica dependente de zinco das metaloproteinases (MMPs), os BFs nitrogenados interrompem a migração e invasão de células tumorais mediada por MMPs em câncer de mama e de próstata (CLÉZARDIN; EBETINO; FOURNIER, 2005).

Em altas concentrações, os BFs nitrogenados reduzem a proliferação das células neoplásicas e induzem a apoptose de diversos tipos de tumores através de sua ação sobre a via do mevalonato, em que geram a ativação das caspases no citoplasma (CLÉZARDIN; EBETINO; FOURNIER, 2005).

Já os efeitos indiretos dos BFs são decorrentes da sua inibição dos osteoclastos, uma vez que essas células reabsortivas liberam fatores de crescimento que se agregam aos ossos e nutrem células tumorais ali presentes (HEYMANN et al., 2004). Os efeitos antitumorais indiretos também podem estar relacionados ao potencial antiangiogênico dos BFs (WAN et al., 2020) e à sua ação sobre o sistema imunológico. Os BFs são capazes de estimular a proliferação de células T  $\gamma\delta$  específicas que, *in vitro*, são citotóxicas para diversas linhagens de células tumorais (HEYMANN et al., 2004).

Diversos estudos demonstraram que os BFs nitrogenados apresentam efeitos antiangiogênicos (HE et al., 2020). Santini et al. (2002) analisaram o efeito do pamidronato em pacientes com metástases ósseas e constataram uma diminuição nos níveis séricos do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) durante a primeira semana de tratamento.

O VEGF é uma proteína que estimula a mitose das células endoteliais e aumenta a permeabilidade vascular (SANTINI et al., 2003). Em um estudo posterior, agora com o ZL,

Santini et al. (2003) evidenciou seu efeito antiangiogênico com a redução dos níveis circulatórios de VEGF em pacientes com câncer.

Estudos apontam que os BFs nitrogenados afetam a atividade das enzimas FPPS das células endoteliais. Hasmim, Bieler e Rüegg (2007) demonstraram que o ZL inibe a adesão, migração e sobrevivência das células endoteliais através da supressão das vias de sinalização dependentes de prenilação.

Guevarra e colaboradores (2015) analisaram o efeito do ZL na vascularização da mandíbula de ratos e constataram diminuição da conectividade e ramificação dos vasos sanguíneos, bem como a redução do seu padrão de organização. Gao et al. (2017) mostraram que o ZL é capaz de suprimir a angiogênese in vivo através da inibição da formação dos osteoclastos e da secreção do fator de crescimento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB), o principal regulador da angiogênese acoplada com a osteogênese.

#### **2.4.2 Denosumab**

O denosumab é um anticorpo humano monoclonal IgG2 que mimetiza as funções da molécula endógena OPG (ALDHALAAN; BAQAIS; AL-OMAR, 2020), tendo alta afinidade e especificidade ao RANKL (ANASTASILAKIS; POLYZOS; MAKRAS, 2018). O denosumab impede a interação do RANKL com o receptor RANK em pré-osteoclastos (MALAN et al., 2012).

Desse modo, o denosumab inibe a reabsorção e aumenta a densidade mineral óssea reduzindo o risco de fraturas. O denosumab bloqueia a formação, atividade e sobrevivência dos osteoclastos (TSOURDI et al., 2021), um mecanismo distinto dos BFs, os quais agem principalmente nos osteoclastos já formados (ANASTASILAKIS; POLYZOS; MAKRAS, 2018).

O denosumab, diferentemente dos BFs, não se incorpora à matriz óssea mineralizada (MISSO et al., 2012) o que contribui para o seu efeito antirreabsortivo ser rapidamente reversível com a interrupção do tratamento (EVERTS-GRABER et al., 2021), o que não ocorre com os BFs, cujas moléculas ficam incorporadas aos ossos durante anos (MISSO et al., 2012).

Em osso cortical, o denosumab apresenta efeitos antirreabsortivos superiores aos BFs. Isso ocorre pois o padrão ósseo trabecular tem metabolismo mais intenso que o osso cortical, portanto, mais moléculas de BFs são liberadas nesses locais com maior remodelação (ANASTASILAKIS; POLYZOS; MAKRAS, 2018).

O denosumab foi aprovado em 2010 pela United States Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de mulheres com osteoporose na pós-menopausa sob alto risco de fratura (LEWIECKI, 2018), na dose de 60 mg por via subcutânea a cada 6 meses (TSOURDI et al., 2021).

Posteriormente, a indicação de denosumab expandiu-se para o tratamento da osteoporose em homens e na osteoporose induzida por glicocorticoides (LEWIECKI, 2018). O denosumab é empregado também na hipercalcemia, doença de Paget (REID et al., 2016) e na prevenção de eventos ósseos relacionados a metástases de tumores sólidos. Sua indicação, contudo, não abrange casos de mieloma múltiplo (BOYCE, 2017).

O denosumab é administrado por via subcutânea na dose de 60 mg a cada 6 meses (Prolia®) (DEEKS, 2018) ou na dose de 120 mg uma vez ao mês após 3 doses semanais de ataque (Xgeva®) (BOYCE, 2017). Posteriormente à aplicação da dosagem de 60 mg, a concentração sérica máxima é alcançada em até 10 dias, diminuindo gradualmente ao longo de 3 a 5 meses (DEEKS, 2018).

A farmacocinética do denosumab é similar à de outros anticorpos monoclonais, sendo dose-dependente e não-linear (BOYCE, 2017). O denosumab não é excretado via renal, portanto, pode ser usado em pacientes com função renal comprometida sem alteração de dose (TERPOS et al., 2021).

A meia-vida do denosumab dura aproximadamente 1 mês, com sua degradação em peptídeos e aminoácidos não envolvendo o sistema hepático (DEEKS, 2018). Caso o tratamento com o denosumab seja descontinuado, ocorre decréscimo da densidade mineral óssea (TSOURDI et al., 2021), elevação dos marcadores do metabolismo ósseo (EVERTS-GRABER et al., 2021) e aumento do risco de fraturas vertebrais (DEEKS, 2018).

Se o tratamento com denosumab for interrompido, os marcadores de remodelação óssea aumentam para valores acima dos encontrados no pré-tratamento, o que constitui o “fenômeno de rebote”. Caso a terapia com denosumab não seja retomada, a densidade mineral óssea que foi obtida é rapidamente perdida, atingindo valores basais dentro de 12 a 24 meses após a última injeção de denosumab (EVERTS-GRABER et al., 2021).

Os medicamentos antirreabsortivos, contudo, podem produzir efeitos colaterais indesejáveis. Os BFs orais estão associados à efeitos gastrointestinais (THERIAULT, 2003) como refluxo esofágico, inflamação e/ou ulceração no esôfago, deglutição dolorosa, dor de cabeça, catarse e obstrução intestinal (ABDIK et al., 2018).

Os BFs de administração intravenosa, por sua vez, podem levar à artralgia, reação de fase aguda, dor nos ossos e articulações, além de inflamação da órbita (ABDIK et al., 2018). O

ZL apresenta baixos riscos de hipofosfatemia, hipocalcemia, hipocalcemia (ANASTASILAKIS; POLYZOS; MAKRAS, 2018), além de febre, calafrios e mialgia (THERIAULT, 2003).

O denosumab, de uma maneira geral, é bem tolerado pelos pacientes, porém foram relatados casos de severa hipocalcemia e fraturas por estresse atípicas (GASTON et al., 2016). Entretanto, o efeito colateral mais severo ocasionado tanto por BFs, quanto pelo denosumab, é a osteonecrose dos maxilares (HE et al., 2020), uma condição rara e debilitante que foi relatada pela primeira vez no ano de 2003, por Robert E. Marx, em um estudo sobre áreas de exposição óssea na região maxilofacial que não cicatrizavam em pacientes tratados com BFs.

## 2.5 MRONJ

### 2.5.1 Características gerais

A osteonecrose dos maxilares (ONJ) é uma condição irreversível na qual o tecido ósseo da maxila ou mandíbula perde sua capacidade de remodelação e vascularização (SOUSA et al., 2018). A AAOMS, em 2007, definiu a osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos (BRONJ) como um sítio de exposição óssea na maxila ou na mandíbula que não se repara dentro de oito semanas, nos pacientes tratados com BFs e que não realizaram radioterapia (Figura 6) (ALDHALAAN; BAQAIS; AL-OMAR, 2020).



Figura 6 – MRONJ (Adaptação de WILLIAMS; O'RYAN, 2015)

No entanto, a BRONJ pode ocorrer sem exposição óssea (NICOLATOU-GALITIS et al., 2019). Nos pacientes tratados com BFs, a BRONJ pode se desenvolver espontaneamente ou pode ser induzida por procedimentos odontológicos invasivos (DINIZ-FREITAS; LIMERES, 2016). Segundo a AAOMS (2007), dois em cada três casos de BRONJ estão relacionados à cirurgia oral, principalmente a extração dentária.

A BRONJ foi relatada pela primeira vez por Marx, em 2003, em um artigo apresentando 36 casos associados ao uso de BFs IV (zoledronato e pamidronato) em pacientes com mieloma múltiplo ou câncer de mama metastático (EGUIA; BAGAN; CARDONA, 2020). Posteriormente, a BRONJ foi observada também em pacientes sob tratamento com denosumab e medicamentos antiangiogênicos (KAWAHARA; KUROSHIMA, 2021), o que levou a AAOMS a alterar a nomenclatura de BRONJ para MRONJ (osteonecrose dos maxilares associada a medicamentos) no ano de 2014 (ALDHALAAN; BAQAIS; AL-OMAR, 2020).

A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, atuando tanto em processos fisiológicos quanto patológicos (GEINDREAU; GHIRINGHELLI; BRUCHARD, 2021). Através da diferenciação de células endoteliais vasculares, a angiogênese favorece o crescimento de tumores e a posterior invasão de estruturas adjacentes (ALDHALAAN; BAQAIS; AL-OMAR, 2020). Os medicamentos antiangiogênicos interrompem a formação de novos vasos sanguíneos atuando nos receptores de VEGF, o que provoca isquemia a qual poderia desencadear a MRONJ (LOMBARD et al., 2016; ALDHALAAN; BAQAIS; AL-OMAR, 2020).

Os fármacos antiangiogênicos são anticorpos monoclonais indicados para o tratamento de carcinomas renais, mamários, colorretais e pulmonares (LOMBARD et al., 2016), sendo classificados basicamente em dois tipos: os inibidores de VEGF e os inibidores das tirocina-quinases (ALDHALAAN; BAQAIS; AL-OMAR, 2020).

Os medicamentos do primeiro grupo, como o anticorpo Bevacizumab, inibem a atividade biológica do VEGF por meio da sua ligação à proteína VEGFA, o que consequentemente interrompe a produção de vasos sanguíneos vitais para o crescimento e expansão dos tumores (LOMBARD et al., 2016; NIFOSÌ et al., 2019).

O primeiro caso de ONJ por Bevacizumab intravenoso foi relatado em 2008, por Estilo e colaboradores, em uma paciente com câncer de mama (NIFOSÌ et al., 2019). No grupo dos inibidores das tirocina-quinases, destaca-se o fármaco Sunitinib, cujo mecanismo de ação é o bloqueio da angiogênese e da via das quinases das células tumorais (SUN, J. et al., 2012). O Sunitinib tem meia-vida de 40 a 60 horas, sendo metabolizado no fígado (NIFOSÌ et al., 2019).

Esse fármaco está relacionado ao aparecimento da MRONJ quando associado à BFs intravenosos (LOMBARD et al., 2016).

A MRONJ é uma condição dolorosa que impacta negativamente a vida dos pacientes acometidos (YANG et al., 2021). A MRONJ dificulta o tratamento dentário e diminui as atividades cotidianas. Isso ocorre em razão da deficiência gerada na mastigação e dos defeitos ósseos mandibulares causados ou pela progressão da MRONJ ou por intervenções cirúrgicas (KAWAHARA; KUROSHIMA, 2021).

### **2.5.2 Sinais e sintomas**

Os sinais e sintomas da MRONJ incluem dor, eritema, ulceração, supuração, parestesia, mobilidade dental não relacionada às doenças periodontais, e, em alguns casos, anestesia do ramo associado do nervo trigêmeo (BROZOSKI et al., 2012; KHAN et al., 2014; PISPATI; PANDEY; PATEL, 2018).

As áreas com exposição óssea podem permanecer assintomáticas por longos períodos de tempo, tornando-se sintomáticas quando os tecidos moles adjacentes inflamam. Ademais, os sinais e sintomas da MRONJ podem ocorrer sem exposição óssea (BROZOSKI et al., 2012; ANESI et al., 2019).

### **2.5.3 Diagnóstico**

O diagnóstico precoce de MRONJ é desafiador (GAÊTA-ARAÚJO et al., 2021), devendo ser baseado no exame clínico e na história médica do paciente (BROZOSKI et al., 2012). Para se concluir o diagnóstico, o paciente deve apresentar: exposição óssea ou osso que possa ser sondado por meio de fístula intraoral ou extraoral nos maxilares, que persistiu por oito semanas ou mais (Figura 7); histórico de tratamento com medicamentos antirreabsortivos ou antiangiogênicos; não ter realizado radioterapia de cabeça e pescoço (PERINI; OLIVEIRA; SEGUIN, 2018).



Figura 7 – Sondagem através de fístula (Adaptação de NICOLATOU-GALITIS et al., 2019)

O diagnóstico diferencial de MRONJ deve considerar alveolite, sinusite, gengivite, periodontite, doenças periapicais, dor dentária, pulpite, neuralgias atípicas, processos neoplásicos, osteomielite esclerosante crônica, dor miofascial e distúrbios articulares (HE et al., 2020).

Ao exame radiográfico, são encontradas escleroses ósseas difusas, com sequestros ósseos, reação periosteal e fístula oro-antral (PERINI et al., 2018). Nos casos severos pode ser encontrada uma imagem radiolúcida mal definida, semelhante a roído de traça (NEVILLE et al., 2009). No entanto, para se observar a extensão da osteonecrose, a tomografia computadorizada e a ressonância magnética são exames superiores em relação às radiografias panorâmicas (ANESI et al., 2019).

Ruggiero, Fantasia e Carlson (2006) classificaram a BRONJ conforme a sua progressão em estágios, uma divisão que foi posteriormente adotada pela AAOMS, em 2007, para estabelecer uma diretriz de tratamento e coletar dados para avaliar o prognóstico da condição (ON et al., 2021).

A MRONJ é atualmente classificada em cinco estágios (NICA et al., 2021). O primeiro deles, o estágio “em risco”, engloba pacientes que estão sob tratamento com bisfosfonatos, mas não apresentam nenhuma evidência de osteonecrose. No estágio 0, não existem sinais clínicos de osteonecrose, porém, há sinais não específicos e alterações radiográficas (LOMBARD et al., 2016; KANG et al., 2018).

O estágio 1 é caracterizado pela exposição de osso necrótico ou presença de fístula, mas sem sinais de infecção nem sintomas. O estágio 2, por sua vez, é sintomático e corresponde à exposição de osso necrótico ou fístula com infecção, dor e eritema. (LOMBARD et al., 2016; KANG et al., 2018).

O estágio 3 é constituído por osso necrótico exposto ou fístula intraoral apresentando sinais e sintomas associados à infecção, bem como osso necrótico exposto invadindo a borda inferior da mandíbula ou do assoalho do seio da maxila e/ou fístula extraoral e/ou fístula oroantral (ON et al., 2021).

#### **2.5.4 Prevalência**

A duração da terapia com bisfosfonatos tem sido associado ao risco de desenvolver MRONJ (OZYURTSEVEN et al., 2021). A probabilidade de desenvolvimento de MRONJ aumenta com a exposição cumulativa do paciente a bisfosfonatos ou denosumab (NICOLATOU-GALITIS et al., 2019). A MRONJ é mais prevalente nos pacientes que recebem altas doses de medicamentos antirreabsortivos do que em pacientes que recebem doses menores (NICOLATOU-GALITIS et al., 2019). De acordo com Passéri; Bértolo; Abuabara (2011), a MRONJ é mais frequente quando o BF é administrado mensalmente, por via intravenosa e durante mais de três anos, com o risco variando entre 0,8% a 12%.

Mais de 90% dos casos de MRONJ correspondem a pacientes oncológicos que receberam altas doses de BFs por via endovenosa, ou que utilizaram denosumab por via subcutânea na dose de 120 mg a cada 4 semanas (NICOLATOU-GALITIS et al., 2019).

Em pacientes com câncer que são expostos a BPs IV, a incidência de MRONJ após exodontia varia de 1,6 a 14,8% (RUGGIERO et al., 2014). Porém, pacientes que utilizam BFs por via oral durante um longo período de tempo também podem desenvolver MRONJ (JESUS et al., 2019).

Segundo Gegler et al. (2006), a incidência de osteonecrose é quatro vezes maior em qualquer área nos pacientes com câncer em relação a população geral. A MRONJ é mais frequente na mandíbula (65% dos casos) do que na maxila (28,4% dos casos), com 6,5% afetando ambas estruturas (KAWAHARA; KUROSHIMA, 2021). A predileção pela mandíbula é geralmente atribuída ao seu suprimento limitado de sangue arterial, bem como à maior proporção de osso cortical em relação ao osso esponjoso nessa estrutura (OTTO et al., 2021).

Estatisticamente, a área posterior é a mais acometida, tanto em maxila quando em mandíbula, provavelmente em decorrência das diferentes taxas de remodelação óssea em locais sob maior força mastigatória (WAN et al., 2020). A MRONJ é mais prevalente também em áreas com uma fina mucosa oral cobrindo proeminências ósseas como tórus e exostoses (BROZOSKI et al., 2012).



### 2.5.5 Etiopatogenia

A etiopatogenia da MRONJ é multifatorial e ainda não está completamente elucidada (LECHNER; VON BAEHR; ZIMMERMANN, 2021). Há três hipóteses complementares principais que procuram explicá-la. (RUGGIERO et al., 2014). A primeira hipótese diz respeito ao mecanismo de ação dos BFs e do denosumab, os quais interrompem a remodelação prejudicando a formação óssea nos maxilares (YANG et al., 2019). Ainda não está claro porque a MRONJ ocorre frequentemente na maxila e na mandíbula (ON et al., 2021).

Devido ao elevado metabolismo da maxila e da mandíbula, especialmente em torno dos ligamentos periodontais, o osso alveolar possui uma taxa de remodelação dez vezes maior que a de ossos longos (LOMBARD et al., 2016). Com isso, acredita-se que os BFs tendem a se depositar nos maxilares (JESUS et al., 2019) e assim predispõem-os à ONJ em comparação com o restante do esqueleto (ON et al., 2021).

A segunda hipótese considera a inibição da angiogênese (YANG et al., 2019). A maxila e a mandíbula contêm elevado suprimento sanguíneo em comparação a outros ossos do organismo (JESUS et al., 2019). Estudos *in vitro* e *in vivo* constataram que os BFs inibem a função de células endoteliais (RUGGIERO; FANTASIA; CARLSON, 2006).

Lang et al. (2016) investigou *in vitro* o efeito do ZL e observou a inibição da proliferação e migração das células endoteliais, bem como o estímulo de apoptose. Ademais, os BFs possuem capacidade de diminuir significativamente os níveis circulantes de VEGF. Com o bloqueio da formação de novos vasos sanguíneos, supõe-se que os medicamentos antirreabsortivos colaborariam para a necrose do tecido ósseo (RUGGIERO; FANTASIA; CARLSON, 2006). No entanto, o denosumab foi investigado *in vitro* e não apresentou efeitos sobre as células endoteliais. Contudo, o denosumab mostrou-se capaz de diminuir a densidade vascular óssea em pacientes com granuloma de células gigantes (GAO et al., 2017).

A terceira hipótese analisa o papel dos micro-organismos na patogênese da MRONJ (YANG et al., 2019). Em comparação a outros ossos do organismo, os maxilares tem maior proximidade com o ar (ABDIKI et al., 2018) e os patógenos da cavidade oral, uma vez que são protegidos apenas por um fino revestimento mucoperiosteal (LOMBARD et al., 2016).

Os maxilares são expostos a repetidos microtraumas devido às forças de mastigação (LOMBARD et al., 2016). Além disso, os dentes molares possuem maior superfície de raiz em comparação com outros dentes, juntamente da presença de furca radicular, o que os torna mais difíceis de acessar com medidas de higiene bucal (OTTO et al., 2021). Com isso, surge uma

rota para micro-organismos e outros processos inflamatórios progredirem dos dentes até o tecido ósseo, tornando a maxila e a mandíbula mais propensas a infecções (HE et al., 2020).

Quando as áreas de exposição de osso necrótico são analisadas em culturas microbianas, identificam-se bactérias comuns da cavidade oral (MAWARDI et al., 2011). Essas bactérias orais seriam responsáveis por infeccionar o osso dos maxilares após intervenções como extrações dentárias e instalação de implantes (ABDIKI et al., 2018).

Sabe-se que as bactérias têm potencial para promover a reabsorção óssea (KHAN et al., 2014). Supõe-se que esses micro-organismos produzam lipopolissacarídeos que ativam o sistema RANK/RANKL/OPG estimulando os osteoclastos a reabsorver o tecido ósseo para delimitar a infecção (ANESI et al., 2019). Contudo, não é claro ainda se a infecção ocorre antes ou após a necrose do tecido ósseo (KHAN et al., 2014). No entanto, a MRONJ pode ocorrer espontaneamente, isto é, sem a presença de infecção ou intervenções dentárias prévias (JESUS et al., 2019).

Além de bactérias, são encontrados no osso necrótico leucócitos polimorfonucleares e células T delta gama. Os linfócitos T são ativados pelos BFs e passam a estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias. Posteriormente, ocorre redução do número de células T delta gama, o que pode prejudicar a resposta do sistema imunológico à infecção (KHAN et al., 2014).

Acredita-se que os BFs lesionem a mucosa oral por meio da alteração da proliferação e da viabilidade dos queratinócitos (YANG et al., 2019). Não foi demonstrado claramente se a MRONJ se desenvolve inicialmente no osso ou é desencadeada por dano à mucosa oral (OZYURTSEVEN et al., 2021).

Dessa forma, a inibição dos osteoclastos e osteoblastos, o bloqueio da angiogênese, a perturbação do sistema imunológico e os danos à mucosa oral provocados pelos BFs impediriam a delimitação do foco infeccioso, desencadeando assim a osteonecrose. Além disso, a predisposição genética é outro possível fator que contribui para o desenvolvimento da MRONJ (YANG et al., 2019).

### **2.5.6 Fatores de risco**

O risco de MRONJ é baixo, mas deve-se considerar uma possível subnotificação uma vez que a exposição óssea pode ser uma consequência tardia da condição (WAN et al., 2020). Os fatores de risco para a MRONJ são classificados em sistêmicos e locais (LECHNER; VON BAEHR; ZIMMERMANN, 2021).

Os principais fatores de risco sistêmicos englobam a quimioterapia para tumores malignos, o uso de corticosteroides, tabaco, presença de doenças cardiovasculares e diabetes (KAWAHARA; KUROSHIMA, 2021). O risco de desenvolvimento de MRONJ aumenta em pacientes diabéticos, uma vez que nesses indivíduos há uma diminuição na qualidade óssea em decorrência de isquemia capilar, redução da função vascular endotelial e de células imunes, além da morte de células ósseas, de osteoblastos e do aumento da inflamação de um modo geral (KANG et al., 2018).

Também são fatores de risco sistêmicos a osteoporose, artrite reumatóide, síndrome de Sjögren, sarcoidose, hipocalcemia, hipoparatiroidismo, osteomalácia, deficiência de vitamina D, diálise renal, anemia, doença de Paget, terapia com eritropoietina, terapia com ciclofosfamida, ingestão de álcool e obesidade (KAWAHARA; KUROSHIMA, 2021).

O uso de esteroides também é um fator de risco tendo em vista a redução do número de células imunes, o atraso da cicatrização de feridas e o aumento da inflamação oral decorrentes do seu emprego (KANG et al., 2018). O risco para MRONJ é maior naqueles pacientes que, concomitante ao uso de antirreabsortivos ou antiangiogênicos, realizaram quimioterapia, terapia com eritropoietina, hemodiálise, corticoterapia ou apresentam hipotireoidismo (JESUS et al., 2019).

O risco de desenvolver MRONJ associado a BFs orais é muito baixo, mas aumenta quando a duração de terapia ultrapassa 4 anos (ROSELLA et al., 2016). O risco de desenvolvimento de MRONJ com o uso de BFs injetáveis em pacientes com tumores malignos é significativamente maior do que quando se usa BFs orais para pacientes com osteoporose (HE et al., 2020).

Pacientes oncológicos que utilizam BFs intravenosos apresentam risco cerca de dez vezes maior de desenvolver a MRONJ em relação aos indivíduos com osteoporose. Esse risco superior pode ser explicado pela dose maior ou pela maior frequência de administração necessária para os pacientes com câncer (YANG et al., 2019). Através de estudos randomizados demonstrou-se que, durante um ano de tratamento com o ZL, o risco é de 0,5%; sob dois anos de terapia, 1%, e, por mais de três anos, o risco passa a ser de 1,3% (KOLPAKOVA et al., 2016).

Em relação ao denosumab, o risco para o desenvolvimento de MRONJ em pacientes com osteoporose é estimado em 0,01 a 0,03%. Já para os pacientes com câncer, o risco aumenta para 1 a 2% com o denosumab (ALDHALAAN; BAQAIS; AL-OMAR, 2020).

Estudos compararam a incidência média de osteonecrose em pacientes tratados com BFs (1.8%) com aqueles que utilizaram denosumab (1.3%), não encontrando diferenças

significativas entre as duas classes de medicamentos (YANG et al., 2019). Foi demonstrada também a associação entre um risco maior para a MRONJ nos indivíduos com ascendência europeia em comparação com outras populações (YANG et al., 2019).

O principal fator de risco local é a exodontia (KAWAHARA; KUROSHIMA, 2021). Cerca de 52 a 61% dos pacientes manifestaram a MRONJ após a realização de extrações dentárias. Além disso, englobam os fatores de risco locais a presença de patologias como doenças periodontais e lesões endodônticas (SOUNDIA et al., 2016).

### **2.5.7 Tratamento**

O tratamento da MRONJ é complexo, uma vez que a sua evolução é difícil de prever (DINIZ-FREITAS; LIMERES, 2016) e não há consenso quanto a sua real eficácia (MORASCHINI et al., 2021). O manejo da MRONJ varia dependendo do estágio clínico da doença (ON et al., 2021) e deve ter como objetivos o controle da dor, da infecção e da progressão da necrose óssea (NICOLATOU-GALITIS et al., 2019).

Para o estágio “em risco”, segundo as recomendações da AAOMS, apenas orientações são passadas ao paciente de modo a informá-lo do potencial de desenvolvimento de MRONJ. Deve-se ressaltar a importância da manutenção de uma boa higiene oral e a necessidade de busca de atendimento precoce ao observar qualquer sinal ou sintoma atípico (ROSELLA et al., 2016; KAWAHARA; KUROSHIMA, 2021).

No estágio 0, são recomendados cuidados como antissepsia, uso de analgésicos e antibióticos. O laser de baixa potência é uma alternativa de tratamento tendo em vista que seu emprego aumenta a quantidade de osteoblastos, auxilia na reparação e estimula a proliferação de vasos sanguíneos e linfáticos (ROSELLA et al., 2016; NICOLATOU-GALITIS et al., 2019).

O tratamento do estágio 1, isto é, com exposição óssea assintomática, engloba a higienização da área exposta com antissépticos e sua cobertura por uma pasta adesiva três vezes ao dia (ROSELLA et al., 2016). A cirurgia imediata não é necessária no estágio 1, porém, pequenos procedimentos cirúrgicos para remoção de osso necrótico são recomendados a fim de reduzir o trauma dos tecidos moles (KAWAHARA; KUROSHIMA, 2021).

No estágio 2, em que há osso exposto dolorido e com inflamação e infecção em tecido mole, a AAOMS sugere antibioticoterapia e desbridamento superficial do osso, aliado às recomendações do estágio 1 (ROSELLA et al., 2016). O estágio 3, o qual é caracterizado pelo estágio 2 mas com expansão da necrose para além do osso alveolar (ON et al., 2021), é tratado com antibacterianos sistêmicos ou em enxaguatórios bucais associado ao controle da dor

(KAWAHARA; KUROSHIMA, 2021). As osteotomias marginais ou segmentares são recomendadas para casos graves (ROSELLA et al., 2016).

Existem terapias adjuvantes com o objetivo de promover a reparação óssea e dos tecidos moles (BERMÚDEZ-BEJARANO et al., 2017), tais como plasma rico em plaquetas, laser de baixa intensidade, terapia com ozônio ou com oxigenação hiperbárica (ON et al., 2021).

Estratégias de tratamento não cirúrgico são indicadas para melhoria e até mesmo resolução da MRONJ (KAWAHARA; KUROSHIMA, 2021). As abordagens conservadoras incluem a manutenção da higiene bucal, eliminando doenças dentais e periodontais ativas, a aplicação de enxaguatórios antibacterianos e o uso de antibioticoterapia sistêmica (NICOLATOU-GALITIS et al., 2019).

Contudo, a revisão sistemática de RUPEL et al. (2014) demonstrou que abordagens cirúrgicas conservadoras e extensas melhoraram a taxa de cura de MRONJ quando comparadas a abordagens não-cirúrgicas. A recuperação de um paciente com MRONJ desencadeada pelo denosumab é mais rápida em comparação a reabilitação na osteonecrose dos maxilares induzida por BFs. Acredita-se que isso ocorra pois o mecanismo do denosumab para inibir os osteoclastos atua na interação OPG/RANK/RANKL, a qual é reversível. Dessa forma, os anticorpos monoclonais não se integram ao osso, diferentemente das moléculas de BFs. Além disso, o denosumab possui uma meia-vida mais curta que a dos BFs (MALAN et al., 2012).

Mesmo que não elimine completamente o risco de MRONJ, a prevenção é efetiva em reduzi-lo. Nesse sentido, a recomendação é que se realizem todos os procedimentos orais invasivos e que se aguarde a recuperação do paciente antes de começar uma terapia com fármacos antirreabsortivos (ANESI et al., 2019).

Inúmeros pesquisadores têm procurado meios confiáveis para prever o risco de MRONJ em pacientes tratados com fármacos antirreabsortivos ou antiangiogênicos que realizarão procedimentos invasivos na cavidade oral, tendo em vista a severidade e a inexistência de um tratamento padrão efetivo para a MRONJ (ALONSO-RODRIGUEZ et al., 2019; ALDHALAAN; BAQAIS; AL-OMAR, 2020).

### **2.5.8 Parâmetros séricos e MRONJ**

Diversos estudos procuram encontrar uma correlação entre biomarcadores e a MRONJ. Contudo, as evidências encontradas na literatura que correlacionam os marcadores do metabolismo ósseo com a MRONJ são controversas (KIM et al., 2016).

O estudo de Lazarovici et al. (2010) avaliou o valor preditivo para MRONJ dos níveis séricos pré-operatórios de CTX, FA óssea e PTH em pacientes tratados com BFs por via oral e endovenosa. Nos pacientes que manifestaram a MRONJ, valores de CTX abaixo de 150 pg/mL foram significativos, assim como os níveis de FA óssea, os quais se mostraram reduzidos nos indivíduos que utilizaram BFs orais. O PTH, contudo, não foi associado à MRONJ. Lazarovici e colaboradores concluíram então que o CTX sérico pode contribuir na avaliação do risco de desenvolvimento de MRONJ antes de cirurgias orais.

Entretanto, Salgueiro et al. (2019) realizaram um estudo retrospectivo correlacionando os níveis séricos do CTX com a MRONJ em pacientes que realizaram terapia com BFs, não encontrando associação significativa entre os valores do CTX pré-operatório e o desenvolvimento de MRONJ no pós-operatório.

Leher et al. (2009) analisaram os valores sanguíneos de CTX, FA óssea e PTH de 7 pacientes com MRONJ induzida por BFs, encontrando diferenças significativas apenas para os níveis de PTH, o qual estava levemente elevado em uma paciente com câncer de mama.

Da mesma forma, Kim et al. (2013) encontraram uma elevação significativa dos níveis de PTH em pacientes com MRONJ, em um estudo de caso controle com 37 indivíduos que utilizaram BFs para osteoporose (35 pacientes) e para metástases ósseas (2 pacientes). Porém, não foram detectadas diferenças significativas para o CTX nem para a FA óssea.

A elevação dos valores séricos de PTH também foi constatada no estudo de Demircan e Isler (2020), que investigou a possível associação entre diversos marcadores ósseos séricos e a MRONJ, analisando para isso 20 pacientes que utilizaram ZL e desenvolveram a osteonecrose e 20 pacientes sem tal patologia, encontrando uma correlação apenas para o PTH.

O estudo de Ardine et al. (2006) avaliou o nível de cálcio sérico de 53 pacientes oncológicos que realizaram terapia com ZL na dose intravenosa de 4 mg a cada 4 semanas, dos quais 13 desenvolveram MRONJ, entre 2002 e 2005. Os valores de cálcio foram menores durante todo o tratamento com bisfosfonatos nos pacientes que manifestaram a MRONJ, em comparação ao grupo controle.

O mesmo estudo comparou os valores séricos de PTH em 6 pacientes com MRONJ com 38 controles que não desenvolveram a osteonecrose. Ardine e colaboradores constataram que o PTH se manteve elevado durante toda a terapia com ZL no grupo que manifestou a MRONJ, o que indica que um estado prolongado de hiperparatireoidismo pode ter um papel importante na patogênese da MRONJ.

Por outro lado, Soares et al. (2019) avaliaram mulheres que utilizaram BFs orais e intravenosos para o tratamento de osteoporose e metástases do câncer de mama, não

encontrando associação significativa entre os níveis séricos de CTX, PTH e cálcio com a manifestação da MRONJ.

Fidan et al. (2012), em um estudo retrospectivo com o objetivo de avaliar os efeitos do ZL nas funções renais, compararam os valores séricos de cálcio, fósforo e FA de 19 pacientes com metástases ósseas do câncer de mama que utilizaram ZL por mais de 6 meses. Os níveis de cálcio e FA não apresentaram diferenças significativas antes e após a última administração de ZL, diferentemente dos valores de fósforo que diminuíram ao final do tratamento.

Koth et al. (2017) realizaram um estudo retrospectivo com 135 pacientes que utilizaram BFs por via oral e intravenosa, dos quais 27 desenvolveram a MRONJ. A análise laboratorial comparou os valores séricos de CTX, PTH, FA, cálcio e fósforo, encontrando diferenças significativas apenas para a FA, a qual mostrou-se elevada no grupo que manifestou a MRONJ.

Contrariamente, Peisker et al. (2018) avaliaram o CTX, o PTH e a FA óssea no sangue de 20 pacientes diagnosticados com MRONJ e de 20 pacientes tratados com BFs, mas sem ocorrência de MRONJ. Após as medições, apenas os valores séricos da FA óssea foram significativos, apresentando decréscimo nos indivíduos com MRONJ em comparação ao grupo controle.

## **2.6 MODELOS ANIMAIS**

Modelos animais são meios imprescindíveis para a pesquisa, uma vez que auxiliam no entendimento de inúmeras patologias que acometem os seres humanos, sem os envolvê-los por questões éticas, colaborando assim na criação e no teste de novos tratamentos (DAMATTA, 2010).

Os princípios do uso experimental de animais e a transposição dos achados nesses modelos para a fisiologia humana foram elaborados em 1865, pelo francês Claude Bernard. A partir de então, o emprego de animais no meio científico expandiu-se de tal forma que atualmente é utilizado em todos os campos da pesquisa biológica (FAGUNDES; TAHA, 2004).

Segundo o Código de Nuremberg, qualquer experimentação em seres humanos precisa ser testada previamente em animais (DAMATTA, 2010). A produção de vacinas e o desenvolvimento de terapias de reposição hormonal figuram entre as diversas conquistas decorrentes da experimentação animal (SHARMA et al., 2013).

Por definição, um modelo experimental em animais deve proporcionar a análise dos fenômenos biológicos ou comportamentais do organismo. Além disso, o modelo deve

possibilitar o estudo de um processo patológico, espontâneo ou induzido, que seja similar ao processo que acontece na espécie humana (FAGUNDES; TAHA, 2004).

Desde a primeira publicação, em 2003, reportando a osteonecrose dos maxilares associada a bisfosfonatos, diversos modelos animais para o estudo dessa patologia foram propostos (SHARMA et al., 2013). Um modelo animal para a MRONJ deve ter como objetivo principal induzir áreas de exposição óssea persistentes. Para isso, além da administração de medicamentos antirreabsortivos, precisam ser considerados cofatores que geralmente estão presentes nos casos em seres humanos, como extração dentária, doença periodontal, estado de imunossupressão e osteoporose (ALLEN, 2007; WAN et al., 2020).

Contudo, os modelos de MRONJ em que não se encontra osso exposto clinicamente também podem ser elaborados, uma vez que a exposição óssea pode ser um efeito tardio da MRONJ (SHARMA et al., 2013). Tendo em vista que o mecanismo de ação dos bisfosfonatos e do denosumab é a interrupção da reabsorção óssea, a espécie animal a ser escolhida como modelo para a MRONJ deve apresentar metabolismo acentuado nos maxilares, tal como ocorre nos seres humanos (ALLEN, 2007).

O emprego de modelos animais na pesquisa da MRONJ é bem documentado na literatura. Um dos primeiros modelos foi desenvolvido com cães beagle, no estudo de Allen e Burr (2008), no qual foi analisado o efeito do AL no osso mandibular administrado em doses semelhantes às utilizadas para o tratamento da osteoporose na doença de Paget e na pós-menopausa. Após três anos sob administração oral de AL, os cães não apresentaram exposição óssea na cavidade oral, entretanto, foram encontradas áreas necróticas na matriz óssea da mandíbula, assim como foi observada uma redução significativa no metabolismo ósseo mandibular.

Historicamente, os roedores são amplamente empregados como modelos experimentais, especialmente para o estudo de patologias esqueléticas (SHARMA et al., 2013). O rato é o animal mais utilizado em pesquisas, seguido do camundongo, coelho, cão, suíno e primatas (FAGUNDES e TAHA, 2004). No entanto, apesar da grande similaridade fisiológica entre roedores e seres humanos, a extrapolação dos resultados dos modelos animais para o homem deve ser feita com cuidado (DAMATTA, 2010).

Holtmann et al. (2018) analisaram 139 estudos com modelos animais para a MRONJ publicados entre 2003 e 2017 e, desses, cerca de 86% empregaram roedores. Esses animais possuem características atrativas para sua escolha como modelo, como seu pequeno porte, sua elevada capacidade reprodutiva, seu metabolismo acentuado e sua grande semelhança genética com a espécie humana.



Diversos estudos com roedores demonstraram que o trauma é um importante fator na etiologia da MRONJ. Biasotto et al. (2010) realizaram extrações dentárias em ratos Wistar administrados com ZL e observaram que os sítios cirúrgicos apresentaram cicatrização prejudicada e exposição óssea.

Entretanto, o papel do trauma não está totalmente esclarecido, uma vez que Barba-Recreo et al. (2013) induziram osteonecrose em ratos Wistar mediante extração dentária e administração crônica de ZL e encontraram alterações radiográficas inclusive nos ossos alveolares dos ratos que não tiveram seus elementos dentários removidos.

A pesquisa com roedores é imprescindível para o entendimento da patogênese da MRONJ (WAN et al., 2020). O estudo de Soundia e colaboradores, em 2016, demonstrou que as patologias dentárias parecem ter um papel determinante na manifestação da osteonecrose em ratos. Foram realizadas extrações dentárias de molares superiores hígidos e de molares superiores com lesão perirradicular, a qual surgiu naturalmente nos animais tratados com ZL e OPG-Fc, um inibidor de RANKL.

Os pesquisadores constataram que os animais sob tratamento com antirreabsortivos e com doença perirradicular apresentaram áreas com osteonecrose, exposição óssea, infiltrado inflamatório persistente e defeitos na mucosa oral, diferentemente dos ratos tratados com ZL e OPG-Fc, mas sem patologias perirradiculares. Esses resultados apontando a influência de doenças orais na MRONJ foram corroborados pelo estudo de Nagata et al. (2017), no qual não foram encontradas lesões osteonecróticas em ratos tratados com ZL que sofreram extração de dentes hígidos.

A hipótese de que a inibição da angiogênese possa contribuir na manifestação da MRONJ foi analisada no estudo de Soares et al. (2018), no qual foi demonstrado em ratos Wistar que o ZL reduz a vascularização dos maxilares. Neto et al. (2016) desenvolveram um modelo experimental de osteonecrose em ratos Holtzman utilizando AL e constataram que a dose total de bisfosfonato empregada por um longo período de tempo influencia na amplitude da redução do metabolismo ósseo.

Os modelos animais auxiliam no entendimento das possíveis alterações no processo de cicatrização dos tecidos periodontais na MRONJ. Mawardi e colaboradores, em estudo de 2011, encontraram associação entre a administração de pamidronato e infecção por *Fusobacterium nucleatum* com a morte de fibroblastos gengivais de roedores. Os autores concluíram que a diminuição dos fibroblastos geraria uma queda nos níveis do fator de crescimento de queratinócito, o que, por sua vez, atrasaria a cicatrização epitelial.

Um dos primeiros modelos animais que não utilizou BFs para induzir a MRONJ foi desenvolvido no estudo de Aghaloo et al. (2014). Os autores testaram RANK-Fc e OPG-Fc em camundongos com doença periapical e conseguiram induzir a osteonecrose sem a realização de extração dentária. Desse modo, Aghaloo e colaboradores demonstraram que a inibição dos osteoclastos tem um papel importante na patogênese da MRONJ.

Os motivos pelos quais a MRONJ ocorre exclusivamente nos ossos maxilares humanos foram investigados por Tsurushima et al. (2013) em ratos Wistar. Para induzir a osteonecrose, os autores não apenas administraram ZL, como também adicionaram o estímulo inflamatório da bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, um microorganismo associado à doença periodontal em humanos. As bactérias foram aplicadas tanto na mandíbula quanto no fêmur dos roedores.

Após a eutanásia, Tsurushima e colaboradores observaram a manifestação da osteonecrose tanto na mandíbula quanto no fêmur dos ratos tratados com o bisfosfonato e sob a ação bacteriana. Concluiu-se então que a ocorrência da MRONJ restrita aos maxilares possa ter a influência crucial da inflamação decorrente dos microorganismos orais, uma vez que a maxila e a mandíbula estão mais expostas à infecção por patógenos quando comparadas a outros ossos do organismo.

Os modelos animais são fundamentais para auxiliar no desenvolvimento de estratégias preventivas e no teste de possíveis terapias para a MRONJ antes da sua aplicação em seres humanos (ALLEN, 2007). O estudo de Cardoso e colaboradores (2018) demonstrou que o emprego do plasma rico em plaquetas (PRP) favorece a resolução das lesões de MRONJ em ratos Wistar tratados com ZL. Hidaka et al. (2019), em um modelo de osteonecrose induzida por AL em ratos ovariectomizados, constataram que a terapia com ultrassom pulsado de baixa intensidade é capaz de provocar respostas sistêmicas regenerativas que aceleram a cicatrização das lesões da MRONJ.

No estudo de Park et al. (2019), implantes foram fixados na maxila de ratos Sprague-Dawley ovariectomizados e tratados com ZL. Um dos grupos de animais recebeu ainda doses de PTH para avaliar seu efeito no osso maxilar. Os autores constataram que o PTH administrado de forma intermitente promoveu a formação óssea peri-implantar, melhorando assim a osseointegração do elemento artificial.

Com esse modelo animal, Park e colaboradores fortaleceram a premissa de que o PTH age como antagonista do efeito supressivo dos antirreabsortivos, podendo ser, futuramente, uma alternativa para evitar a MRONJ nos pacientes tratados com BFs que precisam de implantes dentários.

Paulo et al. (2020) testaram a cerâmica fosfocálcica como possível alternativa terapêutica para prevenir o desenvolvimento de MRONJ em ratos Wistar tratados com ZL. Os pesquisadores observaram que os grânulos de fosfato de cálcio bifásico colocados nos alvéolos imediatamente após a extração dentária conseguem diminuir a toxicidade do bisfosfonato e, dessa forma, favorecer a regeneração tecidual.

Razmara et al. (2021) induziu MRONJ em ratos Wistar utilizando ZL e exodontia bilateral dos primeiros molares mandibulares. O estudo avaliou o uso de scaffold de colágeno e plasma rico em plaquetas na prevenção da MRONJ, encontrando resultados favoráveis na cicatrização alveolar quando os dois métodos são empregados juntos.

Os modelos animais com roedores são fundamentais para ampliar a compreensão da relação entre os marcadores séricos do metabolismo ósseo e a MRONJ. Neto et al. (2013) induziram a MRONJ em ratos Holtzmann através da administração de AL durante 60 dias e da extração do primeiro molar inferior esquerdo. Após 3 e 28 dias da remoção dos dentes, os animais foram eutanasiados e amostras sanguíneas foram obtidas para análise dos marcadores bioquímicos CTX e FA óssea. Neto e colaboradores constataram que tanto o CTX quanto a FA óssea estavam reduzidos nos ratos tratados com AL em comparação ao grupo controle.

Contrariamente, Oh et al. (2014) não encontraram associação entre a administração de AL e alterações nos níveis de CTX. Oh e colaboradores, com o objetivo de avaliar os efeitos do AL no osso peri-implantar da maxila de roedores, extraíram os primeiros molares superiores de ratos Sprague-Dawley. Após 4 semanas de cicatrização, iniciaram um protocolo de administração de AL por via subcutânea, duas vezes na semana.

Foram instalados implantes nos sítios de extração passadas 4 semanas do início do protocolo de AL, o qual seguiu por mais 12 semanas. Terminado o protocolo de AL, os ratos foram eutanasiados em tempos distintos: após 4, 8 e 12 semanas a partir da colocação dos implantes. O CTX foi analisado nas amostras sanguíneas obtidas para cada tempo de eutanásia e não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

Contudo, ainda não existe um modelo animal padrão para a MRONJ, isto é, que simule com precisão a realidade clínica em humanos, considerando todos os fatores que podem estar envolvidos na patogênese da doença (NETO et al., 2016).



### 3 MANUSCRITO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO BRAZILIAN ORAL RESEARCH

## EVALUATION OF SERUM CALCIUM, PHOSPHORUS, PARATHORMONIUM AND ALKALINE PHOSPHATASE IN RATS UNDER THE EFFECT OF ANTIRESORPTIVE DRUGS AND DENTAL EXTRACTION

Themaic area: Oral Pathology

Gabriel Bassan Marinho Maciel<sup>a</sup> (gabrielbmmaciel@yahoo.com.br/ ORCID: 0001-6045-4109); Victor de Mello Palma<sup>b</sup> (victorpalmaod@hotmail.com/ ORCID: 0002-8853-0270); Roberto Marinho Maciel<sup>c</sup> (marinhomacielr@gmail.com/ ORCID: 0001-6954-0388); Kivia Linhares Ferrazzo<sup>c</sup> (kivialinhares@uol.com.br/ ORCID: 0002-6651-5651); Cristiane Cademartori Danesi<sup>c</sup> (cristianedanesi@gmail.com/ ORCID: 0001-9170-5791).

a Postgraduate Program in Dental Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

b Postgraduate Program in Stomatology and Oral Pathology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

c Department of Pathology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

#### **\*Corresponding author**

Gabriel Bassan Marinho Maciel

Department of Pathology, UFSM

Av. Roraima, 1000.

97015-900 Santa Maria - RS - Brazil

Phone: +55-55-3220-8141

gabrielbmmaciel@yahoo.com.br

## ABSTRACT

Medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) is a debilitating bone pathology whose etiopathogenesis is not fully understood, and there is no effective treatment for it. A possible correlation between serum parameters of bone metabolism and MRONJ has been investigated. However, the findings are contrasting with no consensus regarding such an association. This study aims to measure the serum parameters of calcium, phosphorus, parathormone (PTH) and alkaline phosphatase (AP) of 36 Wistar rats at risk stage for MRONJ. The animals received antireabsortive drugs: alendronate (AL), 1 mg/Kg; zoledronic acid (ZL), 0.06 mg/Kg; denosumab (Dmab), 0.25 mg/Kg and underwent extraction of the healthy lower right molar. After 28 days of the extraction, euthanasia was performed by total exsanguination and blood samples were obtained for biochemical evaluation of calcium, phosphorus, PTH and AP. AL or ZL was found to reduce serum calcium concentration ( $P > 0.05$ ), whereas administration of Dmab increased it ( $P > 0.05$ ). In the three medications studied, there was a decline in phosphorus concentration, which was significant only in animals that received ZL ( $P < 0.05$ ). No variations in PTH were observed in any of the treatments. Serum AP increased with Dmab ( $P > 0.05$ ) and decreased with AL or ZL ( $P > 0.05$ ). Knowing the behavior of bone serum parameters is essential to the understanding of the etiopathogenesis of MRONJ. Serum parameters may be useful in future research on preoperative preventive strategies in patients at risk who need to undergo oral interventions.

Keywords: Osteonecrosis. Rats. Alendronate. Zoledronic Acid. Denosumab.

## Introduction

Medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) is a severe and debilitating condition that affects the remodeling and vascularization capacity of the maxillary bones, culminating in the appearance of necrotic bone exposure in trauma areas in the oral cavity<sup>1,2</sup>. The two main etiological agents of MRONJ are extraction<sup>3</sup> and the use of anti-resorptive medications<sup>4</sup>, drugs used in the treatment of bone metabolism disorders such as osteoporosis, Paget's disease and multiple myeloma<sup>5,6,7</sup>.

Antiresorptive drugs such as bisphosphonates and denosumab<sup>8</sup> have great potential to inhibit the activity of osteoclasts, cells responsible for bone resorption<sup>9</sup>, which results in bone strengthening and reducing the risk of pathological fractures<sup>10</sup>.

So far there is no definitive treatment for MRONJ<sup>11</sup>, but different management strategies that vary according to the clinical stage of the disease<sup>12</sup>, aiming to control pain, infection and progression of bone necrosis<sup>13</sup>. In view of the severity and difficulty of managing MRONJ, the correlation between serum parameters of bone metabolism and the development of MRONJ has been investigated<sup>14,15,16</sup>.

Serum parameters of bone metabolism are substances that allow the monitoring of bone resorption or formation activities, reflecting the action of osteoclasts or osteoblasts, respectively<sup>17,18</sup>. Calcium and phosphorus are essential elements for bone mineralization and regulation of various organic processes<sup>19,20</sup>, and their homeostasis is largely regulated by parathyroid hormone (PTH)<sup>21</sup>. Alkaline phosphatase (AP) is essential for bone mineralization<sup>22</sup> as it cleaves inorganic pyrophosphate, a natural calcification inhibitor, thereby increasing the local concentration of phosphorus, which promotes mineralization<sup>23</sup>. Changes in serum levels of calcium, phosphorus, PTH and AP are found in different pathological processes<sup>20</sup>.

Animal models are used in the MRONJ study in order to clarify its etiopathogenesis, test new treatments and search for ways to prevent its development in patients at risk<sup>24,25</sup>. An animal model for MRONJ should simulate the conditions present in cases in human beings, such as the administration of antiresorptive drugs and the presence of trauma in the oral cavity, like tooth extractions<sup>24,26</sup>. Thus, the induction of persistent areas of bone exposure is expected, but MRONJ models that do

not develop clinically exposed bone can also be developed, as it is believed that bone exposure may be a late effect of this pathology<sup>25</sup>.

In this context, this study aimed to measure the serum parameters of calcium, phosphorus, PTH and AP in Wistar rats at risk for the development of MRONJ. For this, the animals received applications of three anti-resorptive drugs (alendronate, zoledronic acid and denosumab) following protocols established in the literature and underwent extraction of the healthy lower right molar. After searching several databases, it appears that this work is pioneer in the simultaneous assessment of serum levels of calcium, phosphorus, PTH and AP in Wistar rats treated with alendronate, zoledronic acid and denosumab.

## **Methodology**

### **Ethical aspects of the experiment**

The research consisted of an *in vivo* experiment conducted with Wistar rats (*Rattus norvegicus*) as an animal model. It is a controlled, blind and randomized study, which was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (CEUA) under number 048169. All handling and experimentation procedures followed the norms prescribed in the Guidelines for Ethical Care of Experimental Animals, approved by the International Animal Care and Use Committee within the Ethical Principles of Experimentation followed by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Santa Maria (CEUA -UFSM).

### **Sample**

Sample calculation was performed using the WinPepi software, considering a study with 80% power and statistical significance set at 5%. The sample calculation was based on the study by Poubel et al. (2017)<sup>27</sup>, which evaluated the role of zoledronic acid and denosumab in the development of MRONJ in 33 Wistar rats. A sample size of five animals per group was estimated, however, considering the risk of loss, the sample size was increased by 10%, thus totaling six animals per experimental group.



## Experimental design

Thirty-six male Wistar rats, heterogeneous, with an average weight of 200g and 3 months of age from the Central Animal Facility of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) were used. The experiment was carried out in the vivarium attached to the Department of Pathology belonging to the Department of Parasitology and Microbiology of the Federal University of Santa Maria (UFSM). The rats were housed in nine polypropylene cages, lined with wood shavings (*Pinus eliottii*), closed with a metal grid and arranged on ventilated shelves. The microenvironment was maintained in an air temperature range of 22 ( $\pm$  2) °C and air humidity of 60%. The luminosity cycle was established for 12 hours (6 to 18h) and at the end of each hour the air volume was filtered (HEPA system) and renewed 100 times.

The animals' food consisted of commercial rodent chow (pellets) and drinking water, both available *ad libitum*. Stress was minimized with environmental enrichment with cardboard tubes. After a seven-day quarantine and adaptation period, the rats were numbered from 1 to 36 and randomly redistributed into four experimental groups using the program "Random Allocation Software, version 1.0, May 2004": negative control (CN), alendronate (GAL), zoledronic acid (GZ) and denosumab (GDmab), occupying 12 cages with 3 rats in each.

The number of animals in each experimental group was based on the study by Neto et al. (2016)<sup>28</sup>. The rats composed a total of six experimental groups. The Negative Control (CN) group was composed of a total of 18 rats, subdivided into 3 negative control groups: the Alendronate Negative Control (CNAL), the Zoledronic Acid Negative Control (CNZ) and the Denosumab Negative Control (CNDmab). The 18 rats in the CN group were treated only with saline solution (NaCl at 0.9%), administered intraperitoneally (IP) and following the same protocol as the other experimental groups. The treatment groups consisted of six animals each and named Alendronate Group (GAL), Zoledronic Acid Group (GZ) and Denosumab Group (GDmab), totaling 18 animals that would receive antiresorptive medications.

Two anesthetic protocols were used. The first protocol was previously applied to surgical procedures and consisted of IP anesthesia with a 10% ketamine association (Cetamin<sup>®</sup>, Syntec do Brasil Ltda, Cotia, SP, Brazil), at a dose of 70 mg/kg with 2%

Xylazine Hydrochloride (Xilazin<sup>®</sup>, Syntec do Brasil Ltda, Cotia, SP, Brazil) at a dose of 6 mg/kg<sup>29</sup>. If bradycardia occurred, the drug atropine sulfate at a dose of 0.044 mg/kg subcutaneously (SC) would be used as an anticholinergic drug.

The second anesthesia protocol was used before intracardiac blood collection and consisted of Isoflurane (Isoflurano Biochimico<sup>®</sup>, Itatiaia, RJ, Brazil) as an inhalation agent<sup>30</sup>. Isoflurane was made available to the animal in cotton swabs inside a glass hood, as well as from a face mask at ambient pressure, so there was no direct contact of Isoflurane with the animals. The analgesia protocol was performed after extraction and in cases in which signs consistent with pain were observed in the animals. Analgesia consisted of the administration of Tramadol Hydrochloride (Tramal<sup>®</sup>, 2 mL ampoule, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu Guaçu, SP, Brazil) at a dose of 20 mg/kg IP<sup>31</sup>.

Alendronate (AL) solution (Galena<sup>®</sup> Química e Farmacêutica, Campinas, SP, Brazil) was obtained by dissolving the monosodium salt of alendronic acid (ALCON Laboratory, São Paulo, SP, Brazil) in physiological saline solution (NaCl at 0,9%) to the appropriate concentration to obtain the dose corresponding to 1mg/kg, according to the study by NETO et al. (2016)<sup>28</sup>. 12 doses of alendronate (1 mg/kg) were administered via SC with an interval of 7 days between applications. The first dose was applied at the beginning of the experiment and the twelfth at the end of 12 weeks. After the application of the eighth dose, there was an interval of 7 days in which the extraction was performed. From then on, treatment continued for another 28 days, until the time of euthanasia. The ninth dose was applied 7 days after extraction.

The administration of zoledronic acid (Zometa<sup>®</sup>, Novartis Pharma, Basel, Switzerland) was based on the protocol used in the study by Zandi et al. (2016)<sup>32</sup>. Zoledronic acid was administered at a dose of 0.06 mg/kg IP, using an insulin syringe, with an interval of two days between applications. The first dose was administered at the beginning of the experiment and the last dose 30 days after the first application, totaling 16 doses. Exodontia occurred 2 days after the last dose was applied. After extraction, 28 days were expected until euthanasia, totaling 60 days of experiment.

The application of denosumab was based on the study of Poubel et al. (2017)<sup>27</sup>. The GDmab animals received a dose of 0.25 mg/kg of denosumab (GlaxoSmithKline<sup>®</sup>,

London), IP, with an insulin syringe, every 4 days, which totaled 8 doses. Four days after the application of the last dose, extraction was performed. After exodontia, a period of 28 days was observed until the execution of euthanasia, thus completing 64 days of the experiment.

### **Exodontia**

The exodontia of healthy lower right molars in rats was performed by a single operator blinded to the experimental groups, using the same surgical technique in all animals. Initially, the rat was immobilized in the dorsal position for the extraction of the lower first molar and injectable dissociative anesthesia was used via IP (6 mg/kg of xylazine associated with 70 mg/kg of ketamine).

Then, with an exploratory probe, the syndesmotomy of the gingival tissue was performed, activating the tip of the probe around the tooth. After gingival detachment, the tooth was dislocated with a hemostatic forceps curved in a mesiodistal and cervico-apical direction, being then divided into two segments with a Hollenback spatula positioned in the furca region of the roots. The segments were extracted with the aid of a hemostatic forceps<sup>27</sup>.

After extraction, all groups received an intramuscular (IM) dose of antibiotic (Pentabiotico<sup>®</sup>, Wyeth-Whitehall Ltda, São Paulo, Brazil, 0.1 mg/kg). There was also the preventive use of tramadol hydrochloride (20 mg/Kg). In the first 24 hours after tooth extraction, the animals were submitted to a liquid diet in which glucose was added to water. After this period, the rats received their usual food again.

### **Euthanasia**

After 28 days of extraction in all groups, the animals were euthanized by total exsanguination, which corresponds to the complete extraction of blood from the cardiac chambers. Euthanasia is an ethical and humanitarian procedure, and the method of exsanguination is provided for in the CONCEA Euthanasia Practice Guideline (Annex I – 2015) of the Ministry of Science, Technology and Innovation, National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA). For this procedure, the rats were anesthetized in a glass hood containing cotton pads soaked

in isoflurane (inhalation anesthesia). The pads with isoflurane remained without direct contact with the animal due to the presence of a screened plastic shield. When the anesthetic plan was verified by the foot reflex test, the animals were removed from the bell and then placed in dorsal decubitus.

At this stage, inhalation anesthesia was maintained by a face mask. In the incision line of the laparotomy procedure (linea alba), 7 mg/kg of lidocaine hydrochloride was applied via SC. This local anesthesia was distributed in buttons from the beginning of the insertion point of the scalpel blade in the abdominal region to the region of the sternal notch, in the chest area, the limit of the incision enlargement to access the heart. The heart was stabilized in the thoracic cavity with the cardiac apex facing outwards to facilitate the penetration of a 25 x 7 mm needle into its chambers.

With 10 ml syringes, continuous blood aspiration was performed without anticoagulant, until the animal was euthanized. Blood sample of approximately 10 mL was collected for the biochemical tests and transferred from the syringe to test tubes in order to avoid hemolysis. Once the blood clot formed, the serum was separated by centrifugation and stored at a temperature of -20°C in properly coded eppendorf tubes. At the end of euthanasia, the carcasses were collected in bags specific for biological waste and kept frozen until collection by a specialized company (Stericycle®).

### **Biochemical analysis**

The following biochemical evaluations were performed: serum concentrations of calcium, phosphorus, parathormone (PTH) and alkaline phosphatase (AP). These tests were carried out in an external laboratory where biochemical analyzes are already standardized and routine. Serum calcium was analyzed by the Arsenazo III method, phosphorus by phosphomolybdate/UV and AP by the spectrophotometric method with the ADVIA 1800® Analyzer (SIEMENS) equipment. PTH was analyzed by chemiluminescence in the ADVIA Centaur® XP Analyzer (SIEMENS).

### **Statistical analysis**

The statistical test used was the unpaired Student's t test, performed using the GraphPad Software Prism program, version 7.00, with a significance level of  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Calcium

The GAL and GZ groups showed a reduction ( $P > 0.05$ ) in the concentration of serum calcium when compared to CNAL and CNZ (Fig.1). In the GDmab there was an increase ( $P > 0.05$ ) in serum calcium when compared to CNDmab. The differences between treatment groups and control groups were not statistically significant.

### Phosphorus

There was a statistically significant decline in phosphorus concentration (Fig. 2) in the GZ ( $P < 0.05$ ) compared with CNZ. In the GAL and GDmab groups, the reduction in serum phosphorus was less expressive ( $P > 0.05$ ) than in CNAL and CNDmab.

### PTH

There were no variations in PTH concentration (Fig.3) in any groups.

### AP

Serum AP activity (Fig. 4) was elevated in GDmab ( $P > 0.05$ ) compared to CNDmab. In the GAL and GZ groups, the AP showed a reduction compared respectively to CNAL and CNZ, with no statistically significant differences ( $P > 0.05$ ).

## DISCUSSION

MRONJ is a debilitating, irreversible and painful condition that generates progressive bone destruction in the maxilla or mandible<sup>33,34,35,36</sup>. A possible association of preoperative values of serum parameters of bone metabolism with the development of MRONJ after surgical interventions has been investigated<sup>16,37,38</sup>. However, there is still no consensus if this association exists, since studies diverge in relation to the drugs analyzed, their dosage, time of use and presence or absence of comorbidities in patients<sup>37,39,40</sup>.

Research with animal models, especially rodents, is an essential tool<sup>40,41</sup> as it allows greater control of the variables involved in the pathogenesis of MRONJ, in addition to the cost reduced, the greater practicality in conducting the experiment and the ethical advantages of not using human beings<sup>41,42,43</sup>.

In the present study, the serum concentration of the parameters of bone metabolism calcium, phosphorus, PTH and AP was simultaneously evaluated for the first time in Wistar rats administered with alendronate, zoledronic acid and denosumab submitted to extraction of a healthy tooth. The application of antiresorptive drugs and tooth extraction was necessary to simulate a state of risk for the manifestation of MRONJ.

The total sample number of 36 rats was defined based on the work by Poubel et al. (2017)<sup>27</sup>. There was the addition of one more rat per group considering the risk of loss during the experiment, which in fact occurred in the CNDmab group, which remained with five animals. The serum parameters chosen for the experiment did not include the C-terminal telopeptide of collagen type I (CTX), considering that the few similar studies with rodents found in the literature focus on its measurement, therefore, priority was given to the evaluation of parameters little or not yet reported, such as calcium, phosphorus and PTH.

The results of this study suggest that zoledronic acid is able to significantly reduce serum phosphorus ( $P = 0.026$ ) in wistar rats at risk for MRONJ. A decline in phosphorus was observed in others treatment groups: GAL (17.65%) and GDmab (15%), with no statistically significant differences.

The concentration of calcium and phosphorus in the body is essential for the physiological processes of bone calcification<sup>23</sup>. It is known that the antiresorptive drugs denosumab and zoledronic acid are able to reduce phosphorus serum levels in patients with osteoporosis<sup>14</sup>. The reduction of phosphorus concentration in the extracellular fluid, up to 2 or 3 times, does not cause immediate effects in humans. However, when hypophosphatemia becomes chronic, lasting for a long period, it incurs in the reduction of bone mineralization<sup>44</sup>.

The findings of this study is in line with the results of the retrospective study by Fidan et al. (2012)<sup>45</sup>, who observed, in a group of 19 patients, a decrease in the serum phosphorus concentration in the post-treatment with zoledronic acid, in relation to the pre-treatment period. Interestingly, oral antiresorptive drugs can generate side effects in the digestive tract, such as intestinal obstruction and stomach complications, which could influence phosphorus balance.

On the other hand, in treatment with IV antiresorptives, such as zoledronic acid, significant hypophosphatemia is not expected, as verified in this study<sup>46,47,48,49</sup>. In contrast, Koth et al. (2017)<sup>15</sup> analyzed patients with MRONJ who used oral and IV BF and found no significant changes in serum phosphorus concentration.

In this study, serum calcium values did not change significantly in any of the groups treated with antiresorptive drugs. Although such alterations were not statistically significant, it is known that variations above or below the mean concentration of calcium can cause disturbances in the organism's balance. In humans, for example, hypocalcemia can cause nervous system excitation and tetany, while hypercalcemia can depress the nervous system and muscle activity<sup>44</sup>.

Alendronate and zoledronic acid have a high affinity for bone tissue, where they bind to hydroxyapatite crystals, being released only when exposed to proteolytic enzymes and acids from active osteoclasts<sup>50</sup>. Excessive bone removal of calcium is controlled by the reduction in the number of osteoclasts via cellular apoptosis<sup>51,52</sup>. In rats, we observed that the action of alendronate was more effective, reducing the concentration of calcium in the blood by 9.35%, while in zoledronic acid, the decline did not exceed 5.45%.

Other studies in humans have not found statistically significant differences in calcium values in patients under the influence of oral and intravenous antiresorptive drugs<sup>15,45</sup>. However, these findings diverge from the investigation by Ardine et al. (2006)<sup>53</sup>, who evaluated the serum calcium of patients administered with zoledronic acid and observed the calcium concentration decrease during the entire treatment with bisphosphonates in patients who developed MRONJ.

A reduction in plasma calcium concentration is expected in treatment with antiresorptive drugs, as the disturbance of bone resorption processes causes less calcium to be released from the bones into the bloodstream. The measurement of serum calcium is important as it could help in the development of preventive measures for the development of MRONJ aimed at controlling the ingestion of this mineral in food<sup>53</sup>.

PTH is the main hormone regulating mineral homeostasis in the body<sup>21</sup>. PTH quickly mobilizes calcium and phosphorus, activating the immediate removal of the two elements directly from the bone. PTH also acts on the kidneys, specifically on the glomeruli, stimulating both calcium reabsorption and phosphorus release<sup>44,54,55,56</sup>.

In the present study, in all groups considered, PTH values were below 4.6 pg/mL, without statistically significant differences, thus suggesting the absence of PTH modulation outside the physiological range. Similarly, PTH did not undergo significant changes in the research on humans by Lazarovici et al. (2010)<sup>37</sup>, Koth et al. (2017)<sup>15</sup>, Peisker et al. (2018)<sup>16</sup> and Soares et al. (2019)<sup>48</sup>.

In contrast, Ardine et al. (2006)<sup>53</sup> observed a statistically significant elevation in plasma PTH concentration in patients administered with zoledronic acid. Likewise, Kim et al. (2013)<sup>57</sup>, in individuals under the influence of oral and IV bisphosphonates, and Demircan and Isler (2020)<sup>40</sup>, in patients treated with zoledronic acid, found an increase in serum PTH levels.

The AP activity is widely used as a marker of bone formation, as it has excellent reproducibility. The elevation of its values is associated with increased osteoblastic activity, as well as it may also be related to liver diseases such as cholestasis, medications such as glucocorticoids and the presence of neoplasms<sup>58</sup>.



In this research, it was observed that alendronate and zoledronic acid promoted reductions in AP activity in the order of 29.48 and 35.03%, respectively, while in the groups treated with denosumab there was an increase of 8.24%. AP plays an important role in bone calcification allowing the mineralization of collagen fibers with calcium salts<sup>44</sup>. The results found in this study suggest that the administration of the antiresorptive drugs alendronate and zoledronic acid hinders the crystallization of hydroxyapatite, considering that the reduction of AP would increase the concentration of pyrophosphate, weakening the bones. Therefore, the use of denosumab would not cause such a deficiency in the bone structure.

Neto et al. (2013)<sup>59</sup> evaluated the behavior of bone AP in Holtzmann rats administered with alendronate and submitted to the extraction of the lower left first molar. Three days after extraction, the researchers found a significant reduction in bone-specific AP levels in rats that received alendronate compared to control animals.

The decrease in the serum concentration of bone-specific AP was also evidenced in rats under the influence of alendronate after 28 days of tooth extraction. The present study is in line with the findings of Neto et al. (2013)<sup>59</sup>, as there was a trend towards a reduction, although not statistically significant, in total AP in GAL rats. This non-significant reduction could be explained by the fact that the laboratory test applied analyzed the total AP present, not bone-specific AP, which may be a limitation of this study.

## CONCLUSION

The findings of this study suggest that the antiresorptive medication zoledronic acid is able to significantly reduce serum phosphorus ( $P = 0.026$ ) in wistar rats at risk for MRONJ. Furthermore, the serum parameters of bone metabolism calcium, PTH and AP are not significantly affected by alendronate, zoledronic acid neither denosumab in wistar rats after dental extraction. There is still no consensus on the association of serum parameters of bone metabolism with the development of MRONJ. These bone markers could help in a better understanding of the condition, as well as

could be applied in prevention, early diagnosis and in search for new treatments, so further investigation is needed in this area.

### **Acknowledgment**

The UFSM Pathology Laboratory team; to CEUA for the authorization of the use of animals.

## REFERENCES

- [1] Sousa AS De, Almeida VP, Taira J, Savedra LF, Rodrigues IV, Giro G. Protocol of dental assistance of patients in treatment with bisphosphonates. *protocolo de atención odontológica de pacientes en tratamiento con bisfosfonatos*. 2018; 54–61.
- [2] Aldhalaan NA, BaQais A, Al-Omar A. Medication-related Osteonecrosis of the Jaw: A Review. *Cureus*. 2020;12(2).
- [3] Kawahara M, Kuroshima S. Clinical considerations for medication-related osteonecrosis of the jaw : a comprehensive literature review. 2021;0.
- [4] Yang G, Singh S, Chen Y, Hamadeh IS, Langae T, McDonough CW, et al. Pharmacogenomics of osteonecrosis of the jaw. *Bone [Internet]*. 2019;124(March):75–82. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.04.010>
- [5] Tuck SP. Adult Paget disease of bone: a tale of two guidelines. *Rheumatology (Oxford)*. 2020; 59(9): 2197–8.
- [6] Nguyen PVQ, Bouin M, Ste-Marie LG. Upper gastrointestinal safety of oral bisphosphonate in hospitalized patients. *Osteoporos Int*. 2021;32(1):193–7.
- [7] Ozyurtseven BT, Serin I, Nursal AF, Pehlivan S, Pehlivan M. Medication - related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) and eNOS Polymorphisms in multiple myeloma patients : a single center experience. 2021;1–7.
- [8] Caires ELP, Bezerra MC, Junqueira AFT de A, Fontenele SM de A, Andrade SC de A, d'Alva CB. Tratamento da osteoporose pós-menopáusia: um algoritmo baseado na literatura para uso no sistema público de saúde. *Rev Bras Reumatol [Internet]*. 2017;57(3):254–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2016.12.001>
- [9] Udagawa N, Koide M, Nakamura M, Nakamichi Y, Yamashita T, Uehara S, et al. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. *J Bone Miner Metab [Internet]*. 2021;39(1):19–26. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00774-020-01162-6>
- [10] Passeri LA, Bértolo MB AA. Ao Uso De Bisfosfonatos. *Rev Bras Reum*. 2011;51(4):404–7.
- [11] Moraschini V, Calasans-Maia MD, Louro RS, Arantes EBR, Calasans-Maia J de A. Weak evidence for the management of medication-related osteonecrosis of the jaw: An overview of systematic reviews and meta-analyses. *J Oral Pathol Med*. 2021;50(1):10–21.
- [12] On SW, Cho SW, Byun SH, Yang BE. Various therapeutic methods for the treatment of medication-related osteonecrosis of the jaw (Mronj) and their limitations: A narrative review on new molecular and cellular therapeutic approaches. *Antioxidants*. 2021;10(5).
- [13] Nicolatou-Galitis O, Schiødt M, Mendes RA, Ripamonti C, Hope S, Drudge-Coates L et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw: definition and best practice for prevention, diagnosis, and treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol [Internet]*. 2019;127(2):117–35. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2018.09.008>
- [14] Miyaoka D, Inaba M, Imanishi Y, Hayashi N, Ohara M, Nagata Y, et al. Denosumab Improves Glomerular Filtration Rate in Osteoporotic Patients With Normal Kidney

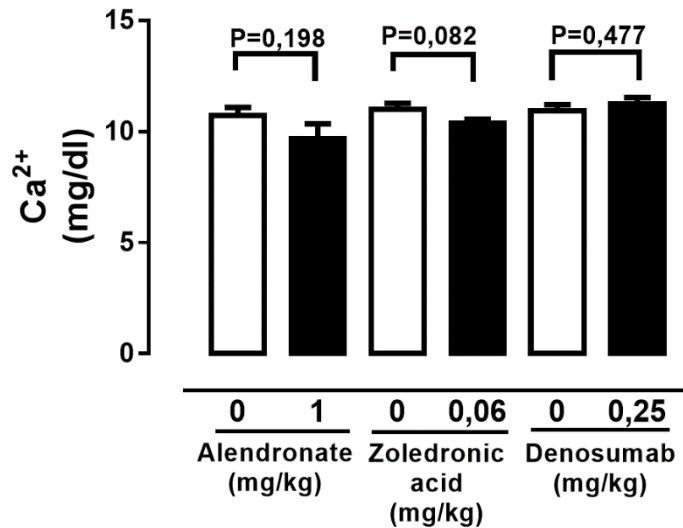
- Function by Lowering Serum Phosphorus. *J Bone Miner Res.* 2019;34(11):2028–35.
- [15] Koth VS, Figueiredo MA, Salum FG, Cherubini K. Interrelationship of clinical, radiographic and haematological features in patients under bisphosphonate therapy. *Dentomaxillofacial Radiol.* 2017;46(4).
- [16] Peisker A, Raschke GF, Fahmy MD, Guentsch A, Roshanghias K, König KC et al. “Cross-Sectional Study of four Serological Bone Turnover Markers for the Risk Assessment of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw.” *The Journal of craniofacial surgery.* 2018; 29(2): 137-40.
- [17] Vieira JGH. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 1999;43(6):415–22.
- [18] Fantasia JE. Bisphosphonates-What the Dentist Needs to Know: Practical Considerations. *J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2009;67(5 SUPPL.):53–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2009.01.011>
- [19] Sun M, Wu X, Yu Y, Wang L, Xie D, Zhang Z, et al. Disorders of Calcium and Phosphorus Metabolism and the Proteomics/Metabolomics-Based Research. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8(September).
- [20] Palacios C, Hofmeyr GJ, Cormick G, Garcia-Casal MN, Peña-Rosas JP, Betrán AP. Current calcium fortification experiences: a review. *Ann N Y Acad Sci.* 2021;1484(1):55–73.
- [21] Poole KES, Reeve J. Parathyroid hormone - A bone anabolic and catabolic agent. *Curr Opin Pharmacol.* 2005;5(6 SPEC. ISS.):612–7.
- [22] Brichacek AL, Brown CM, Biology C, Biology C. HHS Public Access. 2020;34(1):3–19.
- [23] Murshed M. Mechanism of Bone Mineralization. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(12):1–12.
- [24] Allen MR. Animal models of osteonecrosis of the jaw. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2007;7(4):358–60.
- [25] Sharma D, Hamlet S, Petcu E, Ivanovski S. Animal models for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws - an appraisal. *Oral Dis.* 2013;19(8):747–54.
- [26] Wan JT, Sheeley DM, Somerman MJ, Lee JS. Mitigating osteonecrosis of the jaw (ONJ) through preventive dental care and understanding of risk factors. *Bone Res.* 2020;8(1).
- [27] Poubel VL do N, Capella DL, Santos ARS, Correa M, Ruhland L, Rivero ERC. Evaluation of Mandibular Bone After Dental Extraction in Rats Treated With Antiresorptive Drugs. *J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2017; 76(3):474–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2017.07.172>
- [28] Neto CN, Spolidorio LC, Andrade CR de, Esteves JC, Marcantonio E. Experimental osteonecrosis: development of a model in rodents administered alendronate. *Braz Oral Res.* 2016;30(1):e99.
- [29] Garcia VG, Longo M, Fernandes LA, Junior ECG, Dos Santos Santinoni C, Bosco ÁF, et al. Treatment of experimental periodontitis in rats using repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2013;28(1):143–50.

- [30] Taylor NE, Chemali JJ, Brown EN, Solt K. Activation of D1 dopamine receptors induces emergence from isoflurane general anesthesia. *Anesthesiol.* 2013; 118: 30-9.
- [31] Rashidpour M, Ahmad Akhouni MS, Hosseinzadeh Nik T, Dehpour AR, Alaeddini M, Javadi E et al. Effect of Tramadol ( $\mu$ -opioid receptor agonist) on orthodontic tooth movements in a rat model. *Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences.* 2012; 9(2): 83-89.
- [32] Zandi M, Dehghan A, Malekzadeh H, Janbaz P, Ghadermazi K, Amini P. Introducing a protocol to create bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rat animal model. *J Cranio-Maxillo-Facial Surg.* 2016; 44; 271-8.
- [33] Bedogni A, Fusco V, Agrillo A, Campisi G. Learning from experience. Proposal of a refined definition and staging system for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Oral Diseases.* 2012; 18(6): 621-3.
- [34] Campisi G, Fedele S, Fusco V, Pizzo G, Di Fede O, Bedogni A. Epidemiology, clinical manifestations, risk reduction and treatment strategies of jaw osteonecrosis in cancer patients exposed to antiresorptive agents. *Futur Oncol.* 2014;10(2):257–75.
- [35] Fusco V, Bedogni A, Addeo A, Campisi G. Definition and estimation of osteonecrosis of jaw (ONJ), and optimal duration of antiresorptive treatment in bone metastatic cancer patients: supplementary data from the denosumab extension study? *Support Care Cancer* [Internet]. 2017;25(2):345–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00520-016-3147-9>
- [36] Yang G, Collins JM, Rafiee R, Singh S, Langae T, McDonough CW. SIRT1 Gene SNP rs932658 Is Associated With Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2021; 36(2): 347–356.
- [37] Lazarovici TS, Mesilaty-Gross S, Vered I, Pariente C, Kanety H, Givol N, et al. Serologic bone markers for predicting development of osteonecrosis of the jaw in patients receiving bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2010;68(9):2241–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2010.05.043>
- [38] Salgueiro M, Stribos M, Zhang LF, Stevens M, Awad ME, Elsalanty M. Value of pre-operative CTX serum levels in the prediction of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ): a retrospective clinical study. *EPMA Journal.* 2019; 10 (1);21–9.
- [39] Marx RE, Cillo JE, Ulloa JJ. Oral Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis: Risk Factors, Prediction of Risk Using Serum CTX Testing, Prevention, and Treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65(12):2397–410.
- [40] Demircan S, Isler S. Changes in serological bone turnover markers in bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaws: A case control study. *Niger J Clin Pract.* 2020;23(2):154–8.
- [41] Barré-Sinoussi F, Montagutelli X. Animal models are essential to biological research: Issues and perspectives. *Futur Sci OA.* 2015;1(4):4–6.
- [42] Denayer T, Stöhrn T, Van Roy M. Animal models in translational medicine: Validation and prediction. *New Horizons Transl Med* [Internet]. 2014;2(1):5–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nhtm.2014.08.001>

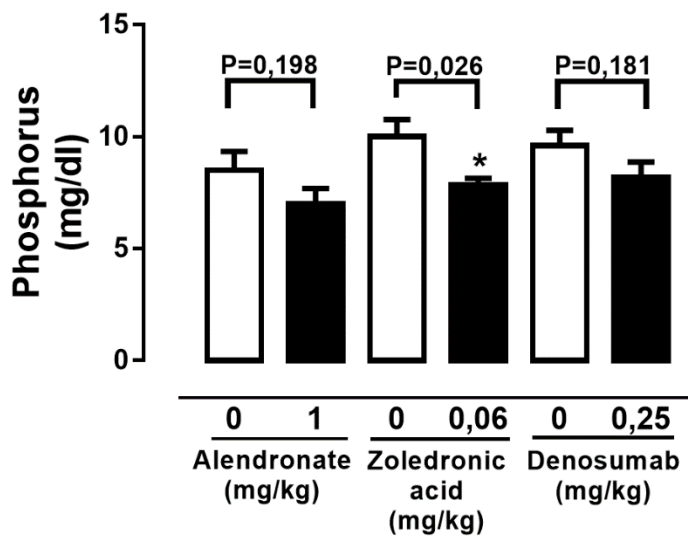
- [43] Damatta RA. Animal models in biomedical research [Abstract in English]. *Sci Med (Porto Alegre)* [Internet]. 2010;20(3):210–1. Available from: <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/scientiamedica/article/view/7728>
- [44] Hall JE. Paratormônio, calcitonina, metabolismo de cálcio e fosfato, vitamina D, ossos e dentes. In: Guyton & Hall Tratado de Fisiologia Médica. 13<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2017.
- [45] Fidan E, Yildiz B, Kavgaci H, Ozdemir F, Aydin F. Effects of zoledronic acid and ibandronic acid on renal functions and calcium, phosphorus and alkaline phosphatase levels in breast cancer patients with bone metastases: A retrospective analysis. *Wspolczesna Onkol.* 2012;16(2):176–8.
- [46] Theriault RL. Zoledronic acid (Zometa®) use in bone disease. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2003;3(2):157–65.
- [47] Griz L, Colares V, Bandeira F. Tratamento da Doença de Paget Óssea: Importância do Ácido Zoledrônico. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006; 50(5).
- [48] Soares AL, Simon S, Gebrim LH, Nazário AC, Lazaretti-Castro M. Prevalence and risk factors of medication-related osteonecrosis of the jaw in osteoporotic and breast cancer patients: a cross-sectional study. *Supportive Care in Cancer.* 2019; 28(5): 2265–71.
- [49] Abdik H, Avşar Abdik E, Demirci S, Doğan A, Turan D, Şahin F. The effects of bisphosphonates on osteonecrosis of jaw bone: a stem cell perspective. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2019;46(1):763–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-018-4532-x>
- [50] Watts NB, Diab DL. Long-term use of bisphosphonates in osteoporosis. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 2010; 95(4):1555-65.
- [51] Ribeiro AF, Volpato NM. Alendronato de sódio: metodologias para análise quantitativa. *Quim Nova.* 2005;28(5):852–8.
- [52] Olszynski WP, Davison KS. Alendronate for the treatment of osteoporosis in men. *Expert Opin Pharmacother.* 2008;9(3):491–8.
- [53] Ardine M, Generali D, Donadio M, Bonardi S, Scoletta M, Vandone AM, et al. Could the long-term persistence of low serum calcium levels and high serum parathyroid hormone levels during bisphosphonate treatment predispose metastatic breast cancer patients to undergo osteonecrosis of the jaw?[5]. *Ann Oncol* [Internet]. 2006;17(8):1336–7.
- [54] Silva BC, Bilezikian JP. Anabolic and Catabolic Pathways of Parathyroid Hormone on the Skeleton. *Parathyroids Basic Clin Concepts Third Ed.* 2015;233–44.
- [55] Jaqueto M, Delfino VDA, Bortolasci CC, Barbosa DS, Morimoto HK, Frange RFN, et al. Are PTH levels related to oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease patients on hemodialysis? *J Bras Nefrol* [Internet]. 2016;38(3):288–95. Available from: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0101-2800.20160045>
- [56] Lofrese LL, Basit H, Lappin SL. Physiology, Parathyroid. [Updated 2020 May 29]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020. PMID: 29494116.
- [57] Kim JW, Kong KA, Kim SJ, Choi SK, Cha IH, Kim MR. Prospective biomarker evaluation in patients with osteonecrosis of the jaw who received bisphosphonates. *Bone* [Internet]. 2013;57(1):201–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2013.08.005>

- [58] Thrall MA. Avaliação laboratorial do fígado. In: Hematologia e bioquímica clínica veterinária. São Paulo: ROCA; 2007. p.582.
- [59] Neto CN, Spolidorio LC, Andrade CR, Bastos SA, Guimarães M, Marcantonio E. Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rodents. Int J Exp Pathol. 2013;94(1):65–73.

**Figure 1.** Serum calcium concentrations in the groups that received Alendronate (1 mg/kg), Zoledronic acid (0.06 mg/kg) and Denosumab (0.25 mg/kg) and their respective control groups.

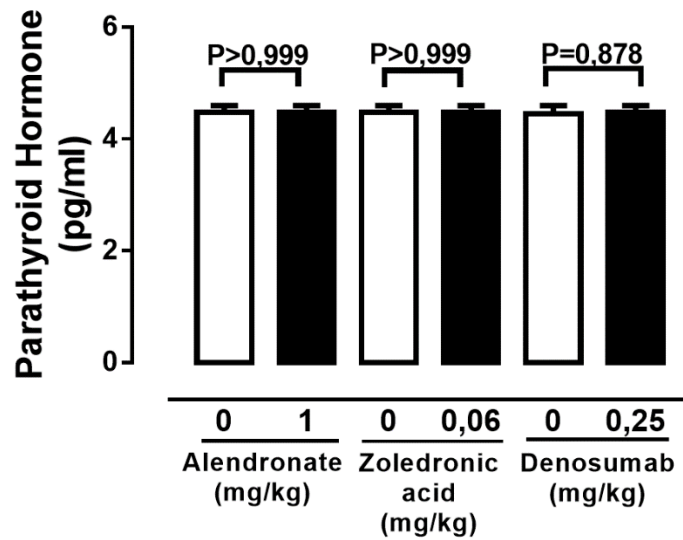


**Figure 2.** Serum phosphorus concentrations in the groups that received Alendronate (1 mg/kg), Zoledronic acid (0.06 mg/kg) and Denosumab (0.25 mg/kg) and their respective control groups.

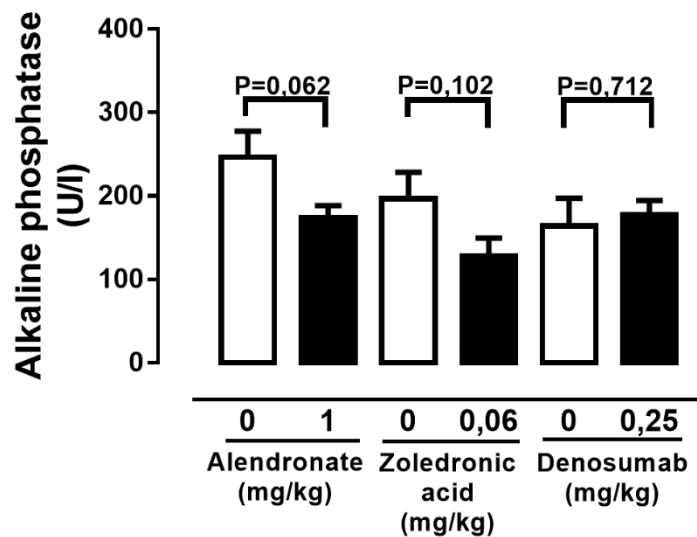




**Figure 3.** Serum concentrations of parathyroid hormone in the groups that received Alendronate (1 mg/kg), Zoledronic acid (0.06 mg/kg) and Denosumab (0.25 mg/kg) and their respective control groups.



**Figure 4.** Serum alkaline phosphatase concentrations in the groups that received Alendronate (1 mg/kg), Zoledronic acid (0.06 mg/kg) and Denosumab (0.25 mg/kg) and their respective control groups.





#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O presente estudo mensurou os parâmetros séricos de cálcio, fósforo, PTH e FA de ratos Wistar sob efeito dos medicamentos antirreabsortivos alendronato, ácido zoledrônico e denosumab e submetidos à exodontia do primeiro molar inferior hígido.

Nesse contexto, pode-se concluir que os fármacos antirreabsortivos avaliados neste estudo não alteram de forma significativa os níveis séricos de cálcio, fósforo, PTH e FA, com exceção do ácido zoledrônico, o qual mostrou-se capaz de reduzir de forma significativa o fósforo sérico ( $P = 0,026$ ).

Ainda não há consenso na literatura a respeito da associação dos parâmetros séricos do metabolismo ósseo com o desenvolvimento da MRONJ, portanto, mais pesquisas são necessárias a fim de elucidar essa questão.



## REFERÊNCIAS

- ABDIK, H. et al. The effects of bisphosphonates on osteonecrosis of jaw bone: a stem cell perspective. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 1, p. 763–76, 2018.
- AGHALOO, T. L. et al. RANKL inhibitors induce osteonecrosis of the jaw in mice with periapical disease. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 29, n. 4, p. 843–54, 2014.
- ALDHALAAN, N. A.; BAQAIS, A.; AL-OMAR, A. Medication-related Osteonecrosis of the Jaw: A Review. **Cureus**, v. 12, n. 2, 2020.
- ALLEN, M. R. Animal models of osteonecrosis of the jaw. **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions**, v. 7, n. 4, p. 358–60, 2007.
- ALLEN, M. R.; BURR, D. B. Mandible Matrix Necrosis in Beagle Dogs After 3 Years of Daily Oral Bisphosphonate Treatment. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 66, n. 5, p. 987–94, 2008.
- ALONSO-RODRIGUEZ, E. et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis. Application of adipose-derived stem cells in an experimental murine model. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. e529–e536, 2019.
- AMADEI, S. U. et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n.1, p. 5–12, 2006.
- AMARASEKARA, D. S. et al. Regulation of osteoclast differentiation by cytokine networks. **Immune Network**, v. 18, n. 1, p. 1–18, 2018.
- ANASTASILAKIS, A. D.; POLYZOS, S. A.; MAKRAS, P. Denosumab vs bisphosphonates for the treatment of postmenopausal osteoporosis. **European Journal of Endocrinology**, v. 179, n. 1, p. 31–45, 2018.
- ANESI, A. et al. From osteoclast differentiation to osteonecrosis of the jaw: Molecular and clinical insights. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, p. 1–17, 2019.
- ARDINE, M. et al. Could the long-term persistence of low serum calcium levels and high serum parathyroid hormone levels during bisphosphonate treatment predispose metastatic breast cancer patients to undergo osteonecrosis of the jaw? **Annals of Oncology**, v. 17, n. 8, p. 1336–7, 2006.
- BARBA-RECREO, P. et al. Zoledronic acid - Related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 42, n. 6, p. 744–50, 2013.
- BARON, R.; FERRARI, S.; RUSSELL, R.G. Denosumab and bisphosphonates: different mechanisms of action and effects. **Bone**, v. 48, n. 4, p. 677-92, 2011.

- BARRÉ-SINOUSSE, F.; MONTAGUTELLI, X. Animal models are essential to biological research issues and perspectives. *Future Sci AO. FSO63*, v. 1, n. 4, 2015.
- BARRETT, J. et al. Ibandronate: A clinical pharmacological and pharmacokinetic update. *Journal of Clinical Pharmacology*, v. 44, n. 9, p. 951–65, 2004.
- BEDOGNI, A. et al., Learning from experience. Proposal of a refined definition and staging system for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Oral Diseases*, v. 18, n. 6, p. 621-3, 2012.
- BERENDSEN, A. D.; OLSEN, B. R. Bone development. *Bone*, v. 80, p. 14–8, 2015.
- BERMÚDEZ-BEJARANO, E. B. et al. Analysis of different therapeutic protocols for osteonecrosis of the jaw associated with oral and intravenous bisphosphonates. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, v. 22, n. 1, p. 43-57, 2017.
- BETH-TASDOGAN, N. H. et al. Interventions for managing medication-related osteonecrosis of the jaw. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. v. 10, n. 10, 2017.
- BIASOTTO, M. et al. A novel animal model to study non-spontaneous bisphosphonates osteonecrosis of jaw. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 39, n. 5, p. 390–6, 2010.
- BIKLE, D. D. Biochemical markers in the assessment of bone disease. *American Journal of Medicine*, v. 103, n. 5, p. 427–436, 1997.
- BONEWALD, L. F. The Role of the Osteocyte in Bone and Nonbone Disease. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, v. 46, n. 1, p. 1–18, 2017.
- BOVBJERG, P. et al. Effect of PTH treatment on bone healing in insufficiency fractures of the pelvis : a systematic review. *EFORT Open Reviews*, v. 4, n. 6, p. 9-14, jan., 2021.
- BOWDEN, S. A.; MAHAN, J. D. Zoledronic acid in pediatric metabolic bone disorders. *Translational Pediatrics*, v. 6, n. 4, p. 256-68, 2017.
- BOYCE, A. M. Denosumab: An Emerging Therapy in Pediatric Bone Disorders. *Current Osteoporosis Reports*, v. 15, n. 4, p. 283–92, 2017.
- BOYCE, B. F. et al. Bone Remodeling and the Role of TRAF3 in Osteoclastic Bone Resorption. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 2263, 2018.
- BRICHACEK, A. L.; BROWN, C. M. Alkaline Phosphatase: A Potential Biomarker for Stroke and Implications for Treatment. *Metabolic Brain Disease*, v. 34, n. 1, p. 3–19, fev., 2019.
- BROZOSKI, M. A. et al. Osteonecrose maxilar associada ao uso de bisfosfonatos. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 52, n. 2, p. 260-70, 2012.
- BUCK, D. W.; DUMANIAN, G. A. Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 129, n. 6, p. 1314-1320, jun., 2012.

- CAMPISI, G. et al. Epidemiology, clinical manifestations, risk reduction and treatment strategies of jaw osteonecrosis in cancer patients exposed to antiresorptive agents. **Future Oncology**, v. 10, n. 2, p. 257-75, 2014.
- CAIRES, E. L. P. et al. Tratamento da osteoporose pós-menopáusia: um algoritmo baseado na literatura para uso no sistema público de saúde. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, n. 3, p. 254–263, 2017.
- CAMPOS, F. S.; PINHATI, F. R. O controle do cálcio e a hipocalcemia. **Cadernos UniFOA**. v. 8, n. 23, dez., 2013.
- CALVO, M. S.; LAMBERG-ALLARDT, C. J. NUTRIENT INFORMATION: Phosphorus. **Advances in nutrition**, v. 6, n. 6, p. 860-2, 2015.
- CARDOSO, C. L. et al. Treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis using platelet-rich plasma: Microtomographic, microscopic, and immunohistochemical analyses. **Brazilian Oral Research**, v. 33, p. 1–12, 2018.
- CARULLI, C.; INNOCENTI, M.; BRANDI, M. L. Bone vascularization in normal and disease conditions. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, p. 1–10, 2013.
- CAWLEY, K. M. et al. Local Production of Osteoprotegerin by Osteoblasts Suppresses Bone Resorption. **Cell Reports**, v. 32, n. 10, p. 108052, set., 2020.
- CHANG, A. R.; ANDERSON, C. Dietary Phosphorus Intake and the Kidney. **Annual Review of Nutrition**, v. 37, p. 321–346, 2017.
- CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. **Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN**, v. 3, n. 3, p. 131–9, 2008.
- CLÉZARDIN, P.; EBETINO, F. H.; FOURNIER, P. G. J. Bisphosphonates and cancer-induced bone disease: Beyond their antiresorptive activity. **Cancer Research**, v. 65, n. 12, p. 4971–4, 2005.
- COMPSTON, J. E.; MCCLUNG, M. R.; LESLIE, W. D. Osteoporosis. **The Lancet**, v. 393, n. 10169, p. 364–76, 2019.
- CONSOLARO, A.; CONSOLARO, M. F. M. O. Os bisfosfonatos e o tratamento ortodôntico: Análise criteriosa e conhecimento prévio são necessários. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 13, n. 4, p. 19–25, 2008.
- CORMICK, G.; BELIZÁN, J. M. Calcium Intake and Health. **Nutrients**, v. 11, n. 7, p. 1–16, jul., 2019.
- DAMATTA, R. A. Animal models in biomedical research. **Scientia Medica**, v. 20, n. 3, p. 210–1, 2010.
- DEEKS, E. D. Denosumab: A Review in Postmenopausal Osteoporosis. **Drugs and Aging**, v. 35, n. 2, p. 163–73, 2018.

- DELAISSE, J. et al. Re-thinking the bone remodeling cycle mechanism and the origin of bone loss. **Bone**, v. 141, p. 115628, abr., 2020.
- DELAISSE, J. et al. The Mechanism Switching the Osteoclast From Short to Long Duration Bone Resorption. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 1–17, mar., 2021.
- DEMIRCAN, S.; ISLER, S. Changes in serological bone turnover markers in bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaws: A case control study. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, v. 23, n. 2, p. 154–8, 2020.
- DENAYER, T.; STÖHRN, T.; VAN ROY, M. Animal models in translational medicine: validation and prediction. **New Horizons in Translational Medicine**, v. 2, n. 1, p. 5-11, 2014.
- DINIZ-FREITAS, M.; LIMERES, J. Prevention of medication-related osteonecrosis of the jaws secondary to tooth extractions. A systematic review. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 21, n. 2, p. e250–e259, 2016.
- DRAKE, M. T.; CLARKE, B. L.; KHOSLA, S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 83, n. 9, p.1032-45, 2008.
- DRETAKIS, K.; IGOUMENOU, V. G. The role of parathyroid hormone (PTH) and vitamin D in falls and hip fracture type. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 31, n. 10, p. 1501-7, 2019.
- DRISSI, H.; SANJAY, A. The Multifaceted Osteoclast; Far and Beyond Bone Resorption. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 117, n. 8, p. 1753–6, 2016.
- DUAN, P.; BONEWALD, L. F. The role of the wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 77, p. 23–9, 2016.
- EASTELL, R. et al. Relationship of early changes in bone resorption to the reduction in fracture risk with risedronate: Review of statistical analysis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 11, p. 1656–1660, 2007.
- EGUIA, A.; BAGAN, L.; CARDONA, F. Review and update on drugs related to the development of osteonecrosis of the jaw. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 25, n. 1, p. e71–e83, 2020.
- EVERTS-GRABER, J. et al. Risk factors for vertebral fractures and bone loss after denosumab discontinuation: A real-world observational study. **Bone**, v. 144, p. 115830, maio., 2021.
- FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 59–65, 2004.
- FANTASIA, J. E. Bisphosphonates-What the Dentist Needs to Know: Practical Considerations. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 67, n. 5, p. 53–60, 2009.



FATOYE, F. et al. Real-world persistence and adherence with oral bisphosphonates for osteoporosis: a systematic review. **BMJ Open** 2019; v. 9, n. 4, p. 1-17, 2019.

FAULKNER, B.; ASTLEFORD, K.; MANSKY, K. C. Regulation of osteoclast differentiation and skeletal maintenance by histone deacetylases. **Molecules**, p. 1–18, 2019.

FIDAN, E. et al. Effects of zoledronic acid and ibandronic acid on renal functions and calcium, phosphorus and alkaline phosphatase levels in breast cancer patients with bone metastases: A retrospective analysis. **Wspolczesna Onkologia**, v. 16, n. 2, p. 176–8, 2012.

FILGUEIRA, S. L. et al. Manifestações clínicas da osteonecrose induzida por medicamentos. **Ciência Atual**, v. 13, n. 1, p. 2-13, 2019.

FINIANOS, A.; ARAGON-CHING, J. B. Zoledronic acid for the treatment of prostate cancer. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 6, p. 657–66, 2019.

FISHER, A. A. et al. Relationships between Myocardial Injury, All-cause Mortality, Vitamin D, PTH, and Biochemical Bone Turnover Markers in Older Patients with Hip Fractures. **Annals of clinical and laboratory science**, v. 37, n. 3. p. 222-32, 2007.

FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

FOURNIER, P. et al. Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. **Cancer Research**. v. 62, p. 6538-44, 2002.

FRAZÃO, P.; NAVEIRA, M. Prevalência de osteoporose: Uma revisão crítica. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 9, n. 2, p. 206–14, 2006.

FUNG, P. et al., Time to onset of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a multicenter retrospective cohort study. **Oral Diseases**, v. 23, n. 4, p. 477-83, 2016.

FUSCO, V. et al., Definition and estimation of osteonecrosis of jaw (ONJ), and optimal duration of antiresorptive treatment in bone metastatic cancer patients: supplementary data from the denosumab extension study? **Supportive Care in Cancer**, v. 25, n. 2, p. 345-9, 2017.

GAÊTA-ARAÚJO, H. et al. Why do some extraction sites develop medication- related osteonecrosis of the jaw and others do not ? **A within-patient study assessing radiographic predictors**, v. 14, n. 1, p. 87–98,

GALLEGO, L. et al. Rubber dam clamp trauma during endodontic treatment: risk factor of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw? **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 69, p. 93-5, 2011.

GAO, S. Y. et al. Zoledronate suppressed angiogenesis and osteogenesis by inhibiting osteoclasts formation and secretion of PDGF-BB. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. 1–15, 2017.

GARCIA, V. G. et al. Treatment of experimental periodontitis in rats using repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, 2012.

GARNERO, P. The Role of Collagen Organization on the Properties of Bone. **Calcified Tissue International**, v. 97, n. 3, p. 229–40, 2015.

GASTON, C. L. et al. Current status and unanswered questions on the use of Denosumab in giant cell tumor of bone. **Clinical Sarcoma Research**, v. 6, n. 1, 2016.

GEGLER, A. et al. Bisfosfonatos e osteonecrose maxilar: revisão da literatura e relato de dois casos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 1, p. 25-31, 2006.

GEINDREAU, M.; GHIRINGHELLI, F.; BRUCHARD, M. Vascular Endothelial Growth Factor, a Key Modulator of the Anti-Tumor Immune Response. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4871, 2021.

GERTZ, B. J. et al. Studies of the oral bioavailability of alendronate. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 58, n. 3, p. 288-98, 1995.

GHIMIRE, S. et al. The investigation of bone fracture healing under intramembranous and endochondral ossification. **Bone Reports**, v. 14, p. 100740, 2021.

GRABOWSKI, P. Physiology of Bone. **Endocrine Development**, v. 28, p. 33–55, 2015.

GREENBLATT, M. B.; TSAI, J. N.; WEIN, M. N. Bone Turnover Markers in the Diagnosis and Monitoring of Metabolic Bone Disease. **Clinical Chemistry**. v. 63, n. 2, p. 464-474, 2017.

GRIZ, L.; COLARES, V.; BANDEIRA, F. Tratamento da Doença de Paget Óssea: Importância do Ácido Zoledrônico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 5, out., 2006.

GUEVARRA, C. S. et al. Vascular alterations in the sprague-dawley rat mandible during intravenous bisphosphonate therapy. **Journal of Oral Implantology**, v. 41, n. 2, p. 24–9, 2015.

HALL, J. E. Paratormônio, calcitonina, metabolismo de cálcio e fosfato, vitamina D, ossos e dentes. In: **Guyton & Hall Tratado de Fisiologia Médica**. 13º ed. Cap. 80, Elsevier: Rio de Janeiro, 2017. 1145p.

HAMMER, G. D.; MCPHEE, S.J. **Fisiopatologia da doença** – uma introdução à medicina clínica. 7ed. Porto Alegre: Artmed. 768p. 2016.

HAN, Y. et al. Biosensors and Bioelectronics Recent progress and prospects of alkaline phosphatase biosensor based on fluorescence strategy. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 148, p. 111811, out., 2020.

HARIDY, Y. et al. Bone metabolism and evolutionary origin of osteocytes: Novel application of FIB-SEM tomography. **Science Advances**, v. 7, n. 14, p. 1–12, 2021.

HASMIM, M.; BIELER, G.; RÜEGG, C. Zoledronate inhibits endothelial cell adhesion, migration and survival through the suppression of multiple, prenylation-dependent signaling pathways. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, n. 1, p. 166–73, 2007.

HAYES, K. N. et al. Duration of Bisphosphonate Drug Holidays in Osteoporosis Patients: A Narrative Review of the Evidence and Considerations for Decision-Making. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 5, p. 1140, 2021.

HE, L. et al. Pathogenesis and multidisciplinary management of medication-related osteonecrosis of the jaw. **International Journal of Oral Science**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2020.

HEINRICH, D. et al. Alkaline phosphatase in metastatic castration-resistant prostate cancer: reassessment of an older biomarker. **Future Oncology**, v. 14, n. 24, p. 2543-56, 2018.

HEYMANN, D. et al. Bisphosphonates: new therapeutic agents for the treatment of bone tumors. **TRENDS in Molecular Medicine**, v. 10, n. 7, 2004.

HIDAKA, K. et al. Low-Intensity Pulsed Ultrasound Prevents Development of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw-Like Pathophysiology in a Rat Model. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 45, n. 7, p. 1721–32, 2019.

HOLSTEIN, S. A. A patent review of bisphosphonates in treating bone disease. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 29, n. 5, p. 315–25, 2019.

HOLTMANN, H. et al. Pathogenesis of medication-related osteonecrosis of the jaw: a comparative study of in vivo and in vitro trials. **Journal of International Medical Research**, v. 0, n. 0, p. 1-20, 2018.

HUNGRIA, V. T. M. Doença óssea em Mieloma Múltiplo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 1, p. 60-6, 2007.

ISERI, K. et al. The effects of denosumab and alendronate on glucocorticoid-induced osteoporosis in patients with glomerular disease: A randomized, controlled trial. **PLoS ONE**, v. 13, n. 3, p. 1–12, 2018.

JACOB, S. W.; FRANCONI, C. A.; LOSSOW, W. J. **Anatomia e Fisiologia Humana**, Rio de Janeiro: Editora Guanabara. 569 p, 1982.

JAQUETO, M. et al. Os níveis de PTH estão relacionados com estresse oxidativo e inflamação em pacientes renais crônicos em hemodiálise? **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 38, n. 3, p. 288-95, 2016.

JESUS, A. P. de et al. Tratamento cirúrgico para osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos: relatos de casos. **Revista da Faculdade de Odontologia - UPF**, v. 24, n. 1, p. 22–30, 2019.

JOSÉ, F. F.; PERNAMBUCO, A. C. A.; DO AMARAL, D. T. Doença de Paget do osso. **Einsten**, 6, s.1, p. 79-88, 2008.

- JUNIOR, C. D. F.; CASADO, P. L.; BARBOZA, E. S. P. Osteonecrose associada aos bisfosfonatos na odontologia. **R. Periodontia**, v. 17, n. 4, p. 18-48, 2007.
- KANG, M. H. et al. Clinical characteristics and recurrence-related factors of medication-related Osteonecrosis of the Jaw. **Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 44, n. 5, p. 225–31, 2018.
- KATSIMBRI, P. The biology of normal bone remodelling. **European Journal of Cancer Care**, v. 26, n. 6, p. 1–5, 2017.
- KAWAHARA, M.; KUROSHIMA, S. Clinical considerations for medication-related osteonecrosis of the jaw: a comprehensive literature review. **International Journal of Implant Dentistry**, v. 14, n. 7, 47 p. maio., 2021.
- KHAJURIA, D. K.; RAZDAN, R.; MAHAPATRA, D. R. Medicamentos para o tratamento da osteoporose: revisão. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, n. 4, p. 365-82, 2011.
- KHAN, A. A. et al. Diagnosis and Management of Osteonecrosis of the Jaw: A Systematic Review and International Consensus. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 30, n. 1, p. 3-23, 2014.
- KHOSLA, S.; OURSLER, M. J.; MONROE, D. G. Estrogen and the skeleton. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 23, n. 11, p. 576-81, 2012.
- KIM, J. W. et al. Prospective biomarker evaluation in patients with osteonecrosis of the jaw who received bisphosphonates. **Bone**, v. 57, n. 1, p. 201–5, 2013.
- KIM, J. W. et al. Biomarkers for Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 18, n. 2, p. 281-91, abr., 2016.
- KOLPAKOVA, M. E. et al. Experimental model of osteonecrosis of the jaw in rats treated with zoledronic acid. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 55, n. 2, p. 156–9, 2016.
- KOTH, V. S. et al. Interrelationship of clinical, radiographic and haematological features in patients under bisphosphonate therapy. **Dentomaxillofacial Radiology**, v. 46, n. 4, 2017.
- LANG, M. et al. Influence of zoledronic acid on proliferation, migration, and apoptosis of vascular endothelial cells. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 54, n. 8, p. 889–93, 2016.
- LAZAROVICI, T. S. et al. Serologic bone markers for predicting development of osteonecrosis of the jaw in patients receiving bisphosphonates. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 68, n. 9, p. 2241–7, 2010.
- LECHNER, J.; BAEHR, V. von; ZIMMERMANN, B. Osteonecrosis of the jaw beyond bisphosphonates: Are there any unknown local risk factors? **Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry**, v. 13, p. 21–37, 2021.

- LEHRER, S. et al. Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaws, Bone Markers, and a Hypothesized Candidate Gene. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 67, n. 1, p. 159–61, 2009.
- LERNER, U. H.; OHLSSON, C. The WNT system: Background and its role in bone. **Journal of Internal Medicine**, v. 277, n. 6, p. 630–49, 2015.
- LEWIECKI, E. M. “New and emerging concepts in the use of denosumab for the treatment of osteoporosis.” **Therapeutic advances in musculoskeletal disease**, v. 10, n. 11, p. 209 – 23, 2018.
- LI, H. et al. Osteoporosis: Mechanism, Molecular Target, and Current Status on Drug Development. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 8, p. 1489–1507, 2021.
- LIU, H. et al. Zoledronic acid blocks the interaction between breast cancer cells and regulatory T-cells. **BMC Cancer**, 19, 176, 2019.
- LOFRESE L. L.; BASIT H.; LAPPIN S. L. Physiology, Parathyroid. [Updated 2020 May 29]. In: **StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; jan., 2020.**
- LOMBARD, T. et al. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: New Insights into Molecular Mechanisms and Cellular Therapeutic Approaches. **Stem Cells International**, v. 2016, 2016.
- LOPES, D. et al. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. **Biomaterials**, v. 185, p. 240–75, 2018.
- LOPES, I. et al. Osteonecrose da mandíbula associada ao uso de bifosfonatos: uma patologia secundária grave. **Arquivos de medicina : revista de ciência e arte médicas**, v. 23, n. 5, p. 181-5, 2019.
- LORENZO-POUSO, A. I. et al. Biomarkers to predict the onset of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: A systematic review. **Medicina oral, patología oral y cirugía bucal**, v. 1, n. 24, p. 26-36, 2019.
- MAEDA, K. et al. The regulation of bone metabolism and disorders by wnt signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, 2019.
- MALAN, J. et al. The relationship of denosumab pharmacology and osteonecrosis of the jaws. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 114, n. 6, p. 671–6, 2012.
- MALUF, G. et al. Surgery combined with LPRF in denosumab osteonecrosis of the jaw: case report. **Brazilian Dental Journal**, v. 27, n. 3, p. 353-8, 2016.
- MALWAL, S. R. et al. Bisphosphonate-Generated ATP-Analogs Inhibit Cell Signaling Pathways. **Journal of the American Chemical Society**, v. 140, n. 24, p. 7568–78, 2018.
- MARAHLEH, A. et al. TNF- $\alpha$  Directly Enhances Osteocyte RANKL Expression and Promotes Osteoclast Formation. **Frontiers in Immunology**, v. 10, dez., 2019.

MARX, R. E.; CILLO, J. E.; ULLOA, J. J. Oral Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis: Risk Factors, Prediction of Risk Using Serum CTX Testing, Prevention, and Treatment. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 65, n. 12, p. 2397–410, 2007.

MASSONE, F. **Anestesiologia veterinária** – farmacologia e técnicas. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

MATSUMOTO, T.; ENDO, I. RANKL as a target for the treatment of osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 39, n. 1, p. 91–105, 2021.

MAWARDI, H. et al. A role of oral bacteria in bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 11, p. 1339–1345, 2011.

MEI, Y. et al. Fluorescence quenching based alkaline phosphatase activity detection. **Talanta**, v. 176, p. 52–58, 2018.

MILANI, C. M. et al. Osteonecrose mandibular associada ao uso de bifosfonato: relato de caso. **Odonto**. v. 20, n. 39, p. 27-33, 2012.

MILLÁN, J. L.; WHYTE, M. P. Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia. **Calcified tissue international**, v. 98, p. 398 – 416, 2016.

MINIELLO, T. G. et al. Influence of bisphosphonates on clinical features of osteoradionecrosis of the maxilla and mandible. **Oral Diseases**, p. 1-8, 2019.

MISSO, G. et al. Evaluation of the in vitro and in vivo antiangiogenic effects of denosumab and zoledronic acid. **Cancer Biology and Therapy**, v. 13, n. 14, p. 1491–1500, 2012.

MIYAMOTO, T. Regulators of osteoclast differentiation and cell-cell fusion. **Keio Journal of Medicine**, v. 60, n. 4, p. 101–5, 2011.

MIYAOKA, D. et al. Denosumab Improves Glomerular Filtration Rate in Osteoporotic Patients With Normal Kidney Function by Lowering Serum Phosphorus. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 34, n. 11, p. 2028–35, 2019.

MORASCHINI, V. et al. Association between biomarkers and medication-related osteonecrosis of the jaws: a systematic review. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 127, n. 6, p. 504-15, 2019.

MORASCHINI, V. et al. Weak evidence for the management of medication-related osteonecrosis of the jaw: An overview of systematic reviews and meta-analyses. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 50, n. 1, p. 10–21, 2021.

MOREIRA, R. O.; M. P.C. DUARTE; FARIAS, M. L. F. Eixo Cálcio-Vit. D nas Hepatopatias Crônicas. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 48, p. 443–50, 2004.

MOTTA, V. T. Enzimas. **Bioquímica Clínica para o laboratório: princípios e interpretações**. 5.ed, v. 9, 400p, 2009.

MURSHED, M. Mechanism of Bone Mineralization. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v.10, abr., 2018.

NAGATA, M. J. H. et al. Long-term therapy with intravenous zoledronate increases the number of nonattached osteoclasts. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 45, n. 11, p. 1860–7, 2017.

NAGY, V.; PENNINGER, J. M. The RANKL-RANK Story. **Gerontology**, v. 61, n. 6, p. 534–42, 2015.

NAKAMURA, H. et al. Dietary Calcium Intake and Hypertension : Importance of Serum Concentrations of 25-Hydroxyvitamin D. **Nutrients**, v. 11, n. 4, 911p. 2019.

NETO, N. C. et al. Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rodents. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 94, p. 65-73, 2013.

NETO, N. C. et al. Experimental osteonecrosis: development of a model in rodents administered alendronate. **Brazilian Oral Research**, v. 30, n. 1, e99, 2016.

NEVILLE, B. et al. **Patologia oral & maxilofacial**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 972 p.

NGUYEN, P. V. Q.; BOUIN, M.; STE-MARIE, L. G. Upper gastrointestinal safety of oral bisphosphonate in hospitalized patients. **Osteoporosis International**, v. 32, n. 1, p. 193–197, 2021.

NICA, D. F. et al. Complementarity of Photo-Biomodulation, Surgical Treatment, and Antibiotherapy for Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws (MRONJ). **Medicina**, v. 57, n. 145, 2021.

NICOLATOU-GALITIS, O. et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw: definition and best practice for prevention, diagnosis, and treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 127, n. 2, p. 117–135, 2019.

NIFOSÌ, A. F. et al. Osteonecrosis of the jaw in the era of targeted therapy and immunotherapy in oncology. **Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 45, n. 1, p. 3–8, 2019.

OH, K. C. et al. Effects of alendronate on the peri-implant bone in rats. **Oral Diseases**, v. 21, n. 2, p. 248–256, 2015.

OLATE, S. et al. Osteonecrosis of the jaw in patient with denosumab therapy. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 10, p. 3707-9, 2014.

OLSZYNSKI, W. P.; DAVISON, K. S. Alendronate for the treatment of osteoporosis in men. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 9, n. 3, p. 491–8, 2008.

ON, S. W. et al. Various therapeutic methods for the treatment of medication-related osteonecrosis of the jaw (Mronj) and their limitations: A narrative review on new molecular and cellular therapeutic approaches. **Antioxidants**, v. 10, n. 5, 2021.

ONO, T.; NAKASHIMA, T. Recent advances in osteoclast biology. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 149, n. 4, p. 325–41, 2018.

ORYAN, A.; SAHVIEH, S. Effects of bisphosphonates on osteoporosis: Focus on zoledronate. **Life Sciences**, v. 264, p. 118681, ago., 2021.

OTTO, S. et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws – characteristics, risk factors, clinical features, localization and impact on oncological treatment. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 40, p. 303-9, 2012.

OTTO, S. et al. Infection as an Important Factor in Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ). **Medicina (Kaunas)**, v. 57, n. 5, p. 1–12, 2021.

OZYURTSEVEN, B. T. et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) and eNOS Polymorphisms in multiple myeloma patients: a single center experience. **BMC Oral Health**, v. 21, n. 272, p. 1–7, 2021.

PADALA, S. A. et al. Epidemiology, Staging, and Management of Multiple Myeloma. **Medical Sciences**, v. 9, n. 1, p. 3, 2021.

PALACIOS, C. et al. Current calcium fortification experiences: a review. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1484, n. 1, p. 55–73, 2021.

PALSULEDESAI, C. C.; DISTEFANO, M. D. Protein Prenylation: Enzymes, Therapeutics, and Biotechnology Applications. **ACS Chemical Biology**, v. 10, n. 1, p. 51-62, 2015.

PARK, J. Y. et al. Enhancement of peri-implant bone formation via parathyroid hormone administration in a rat model at risk for medication-related osteonecrosis of the jaw. **Journal of Periodontal and Implant Science**, v. 50, n. 2, p. 121–31, 2019.

PASSÉRI, L. A.; BÉRTOLO, M. B.; ABUABARA, A. Osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, n. 4, p.401-7, 2011.

PAULO, S. et al. Calcium phosphate ceramics can prevent bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Materials**, v. 13, n. 8, 2020.

PEACOCK, M. Calcium metabolism in health and disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, v. 5, p. 23-30, 2010.

PEACOCK, M. Phosphate Metabolism in Health and Disease. **Calcified Tissue International**, n. 0123456789, 2020.

PEISKER, A. et al. “Cross-Sectional Study of four Serological Bone Turnover Markers for the Risk Assessment of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw.” **The Journal of craniofacial surgery**, v. 29, n. 2, p. 137-40, 2018.



- PEREIRA, I. A.; PEREIRA, R. M. R. Osteoporosis and focal erosive bone lesions in rheumatoid arthritis - Pathogenesis and treatment. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 44, n. 5, p. 347–54, 2004.
- PERINI, A. T.; DE OLIVEIRA, G. R.; SEGUIN, F. Medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) treated with piezosurgery – case report and review of literature. **RSBO**, v. 15, n. 2, p.123-9, 2018.
- PISPATI, A.; PANDEY, V.; PATEL, R. Oral Bisphosphonate Induced Recurrent Osteonecrosis of Jaw with Atypical Femoral Fracture and Subsequent Mandible Fracture in the Same Patient: A Case Report. **Journal of orthopaedic case reports**, v. 8, n. 3, p. 85–8, 2018.
- POOLE, K. E. S.; REEVE, J. Parathyroid hormone – a bone anabolic and catabolic agent. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, n. 6, p. 612-7, 2005.
- POUBEL, V. L. D. N. et al. Evaluation of mandibular bone after dental extraction in rats treated with antiresorptive drugs. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 6, n. 3, p. 474-82, 2017.
- PRESTES, R. C. et al. Caracterização da fibra de colágeno, gelatina e colágeno hidrolisado. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 4, p. 375–82, 2013.
- PU, F.; CHEN, N.; XUE, S. Calcium intake, calcium homeostasis and health. **Food Science and Human Wellness**, v. 5, n. 1, p. 8–16, 2016.
- RAGGATT, L. J.; PARTRIDGE, N. C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25103–8, 2010.
- RALSTON, S. H. Bone structure and metabolism. **Medicine (United Kingdom)**, v. 45, n. 9, p. 560–4, 2017.
- RANG, H. P. et al. **Metabolismo ósseo**. Rang & Dale Farmacologia. 6ªed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 829 p.
- RASHIDPOUR, M. et al. Effect of Tramadol ( $\mu$ -opioid receptor agonist) on orthodontic tooth movements in a rat model. **Journal of Dentistry**, Tehran University of Medical Sciences, v. 9, n. 2, p. 83-89, 2012.
- RAZMARA, F. Application of a collagen scaffold saturated with platelet-rich plasma in prevention of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in the rat animal model. **Heliyon**, v. 7, e06930, 2021.
- REID, I. R. et al. Treatment of Paget’s Disease of Bone with Denosumab: Case Report and Literature Review. **Calcified Tissue International**, v. 99, n. 3, p. 322–5, 2016.
- RIBEIRO, A. F.; VOLPATO, N. M. Alendronato de sódio: metodologias para análise quantitativa. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 852-8, 2005.

- ROSELLA, D. et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw: Clinical and practical guidelines. **Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry**, v. 6, n. 2, p. 97–104, 2016.
- ROSENBERG, A. E. Ossos, articulações e tumores de tecidos moles. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran Patologia** – Bases Patológicas das Doenças. 7 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 1592 p.
- RUDNICKI, M. A.; WILLIAMS, B. O. “Wnt signaling in bone and muscle.” **Bone**, v. 80, 2015.
- RUGGIEIRO, S. L.; DODSON, T.B.; FANTASIA, J. American association of oral and maxillofacial surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw- 2014 update. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 72, n. 10, p. 1938-56, 2014.
- RUGGIERO, S. L. et al. American association of oral and maxillofacial surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of jaws – 2009 update. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 67, n. 1, p. 1-12, 2009.
- RUGGIERO, S. L.; FANTASIA, J.; CARLSON, E. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. **Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 102, n. 4, p. 433-41, 2006.
- RUPEL, K. et al. A systematic review of therapeutical approaches in bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). **Oral Oncology**, v. 50, n. 11, p. 1049–1057, 2014.
- RUSSELL, R. G. G. et al. The Pharmacology of Bisphosphonates and New Insights Into Their Mechanisms of Action. **Journal of bone and mineral research**, v. 14, n. 2, 1999.
- RUSSELL, R. G. G. et al. Mechanisms of action of bisphosphonates: Similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. **Osteoporosis International**, v. 19, n. 6, p. 733–59, 2008.
- SALGUEIRO, M. et al. Value of pre-operative CTX serum levels in the prediction of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ): a retrospective clinical study. **EPMA Journal**, v. 10, n. 1, p. 21–29, 2019.
- SALHOTRA, A. et al. Mechanisms of bone development and repair. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 11, p. 696-711, nov., 2020.
- SAMIEI, M. et al. Early Osteogenic Differentiation Stimulation of Dental Pulp Stem Cells by Calcitriol and Curcumin. **Hindawi Stem Cells International**, v. 2021, 2021.
- SANTINI, D. et al. Pamidronate induces modifications of circulating angiogenetic factors in cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 5, p. 1080–4, 2002.
- SANTINI, D. et al. Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 8, p. 2893–7, 2003.

- SANTOS, P. S. S. et al. Osteonecrose maxilar em pacientes portadores de doenças neoplásicas sob uso de bisfosfonatos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 6, p. 0–3, 2008.
- SARAIVA, G. L.; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 46, n. 1, p.72-8, 2002.
- SCHAFFLER, M. B. et al. Osteocytes: Master orchestrators of bone. **Calcified Tissue International**, v. 94, n. 1, p. 5–24, 2014.
- SEJDINAJ, F.; ZHANG, H. Bone Microenvironment and Role of Rank-Rankl-Opg in Breast Cancer Metastasis in Bone. **Journal of Cancer Prevention & Current Research**, v. 7, 2017.
- SERNA, J.; BERGWITZ, C. Importance of dietary phosphorus for bone metabolism and healthy aging. **Nutrients**, v. 12, n. 10, p. 1–43, 2020.
- SHARMA, D. et al. Animal models for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws - an appraisal. **Oral Diseases**, v. 19, n. 8, p. 747–54, 2013.
- SIDDIQUI, J. A.; PARTRIDGE, N. C. Physiological bone remodeling: Systemic regulation and growth factor involvement. **Physiology**, v. 31, n. 3, p. 233–45, 2016.
- SINGH, S.; BRAY, T. J. P.; HALL-CRAGGS, M. A. Quantifying bone structure, micro-architecture, and pathophysiology with MRI. **Clinical Radiology**, v. 73, p. 221-230, 2018.
- SILVA, B. C.; BILEZIKIAN, J. P. Anabolic and Catabolic Pathways of Parathyroid Hormone on the Skeleton. **The Parathyroids: Basic and Clinical Concepts: Third Edition**, p. 233–44, 2015. 946 p.
- SILVA, R. O. P. E. et al. Mieloma múltiplo: Características clínicas e laboratoriais ao diagnóstico e estudo prognóstico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 2, p. 63–8, 2009.
- SILVA, T. F. da; PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 530–9, 2012.
- SIVARAJ, K. K.; ADAMS, R. H. Blood vessel formation and function in bone. **Development (Cambridge)**, v. 143, n. 15, p. 2706–15, 2016.
- SOARES, A. L. et al. Prevalence and risk factors of medication-related osteonecrosis of the jaw in osteoporotic and breast cancer patients: a cross-sectional study. **Supportive Care in Cancer**, v. 28, n. 5, p. 2265–71, 2019.
- SOUNDIA, A. et al. Osteonecrosis of the jaws (ONJ) in mice after extraction of teeth with periradicular disease. **Bone**, v. 90, p. 133–41, 2016.
- SOUSA, A. S. de. et al. Protocolo de atendimento odontológico de pacientes em tratamento com bisfosfonatos. **Revista Saúde**, v. 12, n.1-2, p. 54-61, 2018.

- SOUZA, K. G. et al. The influence of zinco on bone repair: A literature review. **Revista Virtual de Quimica**, v. 10, n. 3, p. 474–86, 2018.
- SOUZA, M. P. G. de. Diagnóstico e tratamento da osteoporose. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 45, n. 3, p. 220–9, 2010.
- STRESING, V. et al. Nitrogen-containing bisphosphonates can inhibit angiogenesis in vivo without the involvement of farnesyl pyrophosphate synthase. **Bone**, v. 48, n. 2, p. 259–66, 2011.
- SUN, J. et al. The multi-targeted kinase inhibitor sunitinib induces apoptosis in colon cancer cells via PUMA. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1–10, 2012.
- SUN, M. et al. Disorders of Calcium and Phosphorus Metabolism and the Proteomics/Metabolomics-Based Research. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, set., 2020.
- TAKITO, J.; INOUE, S.; NAKAMURA, M. The sealing zone in osteoclasts: A self-organized structure on the bone. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, 2018.
- TANG, Z. et al. Assays for alkaline phosphatase activity: Progress and prospects. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 113, p. 32–43, 2019.
- TAYLOR, N. E. et al. Activation of D1 dopamine receptors induces emergence from isoflurane general anesthesia. **Anesthesiology**, v. 118, p. 30-39, jan., 2013.
- TERPOS, E. et al. Denosumab compared with zoledronic acid on PFS in multiple myeloma: Exploratory results of an international phase 3 study. **Blood Advances**, v. 5, n. 3, p. 725–736, 2021.
- TERZI, H. et al. Efeito da multiparidade sobre a densidade mineral óssea, avaliada por marcadores de remodelação óssea. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, n. 5, p. 371-7, 2017.
- TUCK, S. P. Adult Paget disease of bone : a tale of two guidelines. **Rheumatology (Oxford)**, v. 59, n. 9, p. 2197–2198, jun., 2020.
- THERIAULT, R. L. Zoledronic acid (Zometa®) use in bone disease. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 3, n. 2, p. 157–65, 2003.
- THIEL, A. et al. Osteoblast migration in vertebrate bone. **Biological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 350–63, 2018.
- THRALL, M. A. Avaliação laboratorial do fígado. In: **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. Cap. 23, ROCA: São Paulo, p. 582, 2007.
- TRAVLOS, G. S. Normal Structure, Function, and Histology of the Bone Marrow. **Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 5, p. 548–565, 2006.

- TSOURDI, E. et al. Fracture Risk and Management of Discontinuation of Denosumab Therapy: A Systematic Review and Position Statement by ECTS. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 106, n. 1, p. 264–281, 2021.
- TSURUSHIMA, H. et al. Bacterial promotion of bisphosphonate-induced osteonecrosis in Wistar rats. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 42, n. 11, p. 1481–7, 2013.
- UDAGAWA, N. et al. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 39, n. 1, p. 19–26, 2021.
- UKON, Y. et al. Molecular-Based Treatment Strategies for Osteoporosis: A Literature Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, 2019.
- UNAL, M.; CREECY, A.; NYMAN, J. S. The Role of Matrix Composition in the Mechanical Behavior of Bone. **Current Osteoporosis Reports**, v. 16, n. 3, p. 205–15, 2018.
- VALENZUELA, E. N.; PIETSCHMANN, P. Epidemiologie und Pathologie des Morbus Paget – ein Überblick. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 167, n. 1–2, p. 2–8, 2017.
- VASCONCELLOS, D. V; DUARTE, M. E. L.; MAIA, R. C. Efeito Anti-Tumoral dos Bisfosfonatos: uma Nova Perspectiva Terapêutica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 50, n. 1, p. 45–54, 2004.
- VELDURTHY, V. et al. Vitamin D, calcium homeostasis and aging. **Bone Research**, v. 4, n. 16041, p. 1–7, jul., 2016.
- VIEIRA, J. G. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 43, n. 6, p. 415–22, 1999.
- VIMALRAJ, S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. **Gene**, v. 754, n. June, p. 144855, 2020.
- VORLAND, C. J. et al. Effects of Excessive Dietary Phosphorus Intake on Bone Health. **Current Osteoporosis Reports**, v. 15, n. 5, p. 473–482, 2017.
- WAN, J. T. et al. Mitigating osteonecrosis of the jaw (ONJ) through preventive dental care and understanding of risk factors. **Bone Research**, v. 8, n. 1, 2020.
- WANG, A.; ZHONG, H. Roles of the bone marrow niche in hematopoiesis, leukemogenesis, and chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia. **Hematology**, v. 23, n. 10, p. 729–39, 2018.
- WANG, H. et al. The endocrine role of bone: Novel functions of bone-derived cytokines. **Biochemical Pharmacology**, v. 183, out., 2021.
- WATTS, N. B.; DIAB, D. L. Long-term use of bisphosphonates in osteoporosis. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, n. 4, p. 1555–65, 2010.

- WEIN, M. N.; KRONENBERG, H. M. Regulation of bone remodeling by parathyroid hormone. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 8, 2018.
- WIDLER, L. et al. Highly potent geminal bisphosphonates. From pamidronate disodium (Aredia) to zoledronic acid (Zometa). **Journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 17, p. 3721–38, 2002.
- WILLIAMS, W. B.; O'RYAN, F. Management of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 27, n. 4, p. 517–525, 2015.
- XIE, M.; CHAGIN, A. S. The epiphyseal secondary ossification center: Evolution, development and function. **Bone**, v. 142, n. August 2020, p. 115701, 2021.
- XU, F.; TEITELBAUM, S. L. Osteoclasts: New Insights. **Bone Research**, v. 1, n. 1, p. 11–26, 2013.
- YANG, G. et al. Pharmacogenomics of osteonecrosis of the jaw. **Bone**, v. 124, p. 75–82, mar., 2019.
- YANG, G. et al. SIRT1 Gene SNP rs932658 Is Associated With Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 36, n. 2, p. 347–356, 2021.
- ZANATA, A. et al. Osteonecrose mandibular associada ao uso de bisfosfonato de sódio em pacientes com mieloma múltiplo. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, v. 55, n. 2, p.115-20, 2014.
- ZANDI, M. et al. Introducing a protocol to create bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rat animal model. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 44, p. 271-8, 2016.
- ZHAO, T. et al. Quantification of the bisphosphonate alendronate using capillary electrophoresis mass spectrometry with dynamic pH barrage junction focusing. **Electrophoresis**, v. 42, n. 4, p. 350–359, 2021.

## ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Comissão de Ética no Uso de Animais

da  
Universidade Federal de Santa Maria

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DE MODELOS DE OSTEONECROSE MANDIBULAR INDUZIDA POR DROGAS ANTIRREABSORPTIVAS EM RATOS WISTAR", protocolada sob o CEUA nº 9967260318 (ID 002000), sob a responsabilidade de **Cristiane Cademartori Danesi e equipe; Victor de Mello Palma; Eva Aguiar Almeida Campos Castro Torriani; Roberto Marinho Maciel; Gustavo Nogara Dotto; Kivia Linhares Ferrazzo; Raquel Cristine Silva Barcelos; Luisa Machado Barin; Luisa Berlato Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 07/06/2018.

We certify that the proposal "EVALUATION OF MANDIBULAR INDUCED OSTEONECROSIS MODELS BY ANTIRREABORESTATIVE DRUGS IN WISTAR RATS", utilizing 36 Heterogenics rats (36 males), protocol number CEUA 9967260318 (ID 002000), under the responsibility of **Cristiane Cademartori Danesi and team; Victor de Mello Palma; Eva Aguiar Almeida Campos Castro Torriani; Roberto Marinho Maciel; Gustavo Nogara Dotto; Kivia Linhares Ferrazzo; Raquel Cristine Silva Barcelos; Luisa Machado Barin; Luisa Berlato Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 06/07/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [04/2018](#) a [08/2019](#) Área: [Bioquímica E Biologia Molecular](#)

Origem: [Biotério Central UFSM](#)  
 Espécie: [Ratos heterogênicos](#) sexo: [Machos](#) idade: [2 a 3 meses](#) N: [36](#)  
 Linhagem: [Wistar](#) Peso: [200 a 300 g](#)

Local do experimento: Biotério setorial da Parasitologia (prédio 20) LAPBIO Laboratório de Patologia e Biologia Oral (prédio 20)

Santa Maria, 02 de junho de 2020

Profa. Dra. Patrícia Severo do Nascimento  
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho  
 Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Universidade Federal de Santa Maria





## ANEXO B - NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIODICO BRAZILIAN ORAL RESEARCH.



Open Access

**Brazilian Oral Research**

Publication of: Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica - SBPqO

Area: Health Sciences

ISSN printed version: 1806-8324 ISSN online version: 1807-3107

### Instructions to authors

#### Mission, scope, and submission policy

Brazilian Oral Research - BOR (online version ISSN 1807-3107) is the official publication of the *Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica* - SBPqO (the Brazilian division of the International Association for Dental Research - IADR). The is rated A2 Qualis Capes (Dentistry), Impact Factor <sup>TM</sup> / 20182019 1,508 (Institute for Scientific Information - ISI), is peer-reviewed (double-blind system), and its mission is to disseminate and promote an information interchange concerning the several fields in dentistry research and/or related areas with gold open access.

**BOR** accepts submission of the following typologies: Original Research (complete manuscript or Short Communication), Systematic Review (and Meta-Analysis) and Letters to the Editor. All submissions must be exclusive to BOR.

Critical literature reviews are articles written at the invitation of the editor.

Manuscripts and all corresponding documentation should be exclusively submitted through ScholarOne Manuscripts<sup>TM</sup> via the online submission link (<http://mc04.manuscriptcentral.com/bor-scielo>).

The evaluation process of manuscript's scientific content will only be initiated after meeting of all the requirements described in the present Instructions for Authors. Any manuscript that does not meet these requirements will be returned to the corresponding author for adaptations.

**Important:** Once having been accepted on their scientific merit, all manuscripts will be submitted for grammar and style revision as per the English language. Contact BOR by [bor@sbpgo.org.br](mailto:bor@sbpgo.org.br) to get information about the recommended translation companies. The authors should forward the revised text with the enclosed revision certificate provided by the chosen editing company. **Linguistic revisions performed by companies that are not among those indicated by BOR will not be accepted.**

### **Presentation of the manuscript**

The manuscript text should be written in English and provided in a digital file compatible with “Microsoft Word” (in DOC, DOCX, or RTF format).

All figures (including those in layouts/combinations) must be provided in individual and separate files, according to recommendations described under the specific topic.

Photographs, micrographs, and radiographs should be provided in TIFF format, according to the recommendations described under the specific topic.

Charts, drawings, layouts, and other vector illustrations must be provided in a PDF format individually in separate files, according to the recommendations described under the specific topic.

Video files may be submitted as per the specifications, including the author’s anonymity (for purposes of evaluation) and respect for the patient’s rights.

Important: ScholarOne™ allows upload of a set of files up to 10 MB. In case the video file exceeds this size, it is possible to leave information about the link to access the video. The use of patients’ initials, names, and/or registry numbers is prohibited in the reproduction of clinical documentation. The identification of patients is prohibited. An informed consent statement, signed by the patient, concerning the use of his/her image should be provided by the author(s) when requested by **BOR**. The Copyright legislation in force must be respected and the source cited when the manuscript reproduces any previously published material (including texts, charts, tables, figures, or any other materials).

### **Title page (compulsory data)**

- Indication of the thematic area of the research focused on in the manuscript.
- Thematic Areas: Anatomy; Basic Implantodontology and Biomaterials; Behavioral Sciences; Biochemistry; Cariology; Community Dental Health; Craniofacial Biology; Dental Materials; Dentistry; Endodontic Therapy; Forensic Dentistry; Geriatric Dentistry; Imaginology; Immunology; Implantodontology – Prosthetics; Implantodontology – Surgical; Infection Control; Microbiology; Mouth and Jaw Surgery; Occlusion; Oral Pathology; Orthodontics; Orthopedics; Pediatric Dentistry; Periodontics; Pharmacology; Physiology; Prosthesis; Pulp Biology; Social/Community Dentistry; Stomatology; Temporomandibular Joint Dysfunction.

- Informative and concise title, limited to a maximum of 110 characters, including spaces.
- Full names of all authors, including their e-mail, and ORCID.

Authors are recommended to compare their names noted on the Title Page with the profile created in ScholarOne™, in order to avoid incompatibilities.

- Institutional/professional affiliation data for all authors, including university or entity in the original language, college/course in English, department in English, city, state and country. **Only one affiliation per author is accepted.** Check that affiliations have been entered correctly in ScholarOne™.

## Main Text

**Abstract:** Must be presented as a single paragraph (without subdivisions into sections, containing objective, methodology, results, and conclusions). In the System if applicable, use the Special characters tool for special characters.

**Keywords:** Ranging from 3 (three) to 5 (five) main descriptors should be provided, chosen from the keywords registered at <https://meshb.nlm.nih.gov/search> (no synonyms will be accepted).

**Introduction:** This should present the relevance of the study, and its connection with other published works in the same line of research or field, identifying its limitations and possible biases. The objective of the study should be concisely presented at the end of this section.

**Methodology:** All the features of the material pertinent to the research subject should be provided (*e.g.*, tissue samples or research subjects). The experimental, analytical, and statistical methods should be described in a concise manner, although in detail, sufficient to allow others to recreate the work. Data from manufacturers or suppliers of products, equipment, or software must be explicit when first mentioned in this section, as follows: manufacturer's name, city, and country. The computer programs and statistical methods must also be specified. Unless the objective of the work is to compare products or specific systems, the trade names of techniques, as well as products, or scientific and clinical equipment should only be cited in the "Methodology" and "Acknowledgments" sections, according to each case. Generic names should be used in the remainder of the manuscript, including the title. Manuscripts containing radiographs, microradiographs, or SEM images, the following information must be included: radiation source, filters, and kV levels used. Manuscripts reporting studies on humans should include proof that the research was ethically

conducted according to the Helsinki Declaration (*World Medical Association*, <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>). The approval protocol number issued by an Institutional Ethics Committee must be cited. Observational studies should follow the STROBE guidelines (<http://strobe-statement.org/>), and the check list must be submitted. Clinical Trials must be reported according to the CONSORT Statement standard protocol (<http://www.consort-statement.org/>); systematic reviews and meta-analysis must follow the PRISMA (<http://www.prisma-statement.org/>), or Cochrane protocol (<http://www.cochrane.org/>).

### Clinical Trials

Clinical Trials according to the CONSORT guidelines, available at [www.consort-statement.org](http://www.consort-statement.org). The clinical trial registration number and the research registration name will be published along with the article.

Manuscripts reporting studies performed on animals must also include proof that the research was conducted in an ethical manner, and the approval protocol number issued by an Institutional Ethics Committee should be cited. In case the research contains a gene registration, before submission, the new gene sequences must be included in a public database, and the access number should be provided to BOR. The authors may use the following databases:

- GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/submit>
- EMBL: <http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/index.html>
- DDBJ: <http://www.ddbj.nig.ac.jp>

Manuscript submissions including microarray data must include the information recommended by the MIAME guidelines (Minimum Information About a Microarray Experiment: <http://www.mged.org/index.html>) and/or itemize how the experimental details were submitted to a publicly available database, such as:

- ArrayExpress: <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>
- GEO: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

**Results:** These should be presented in the same order as the experiment was performed, as described under the “Methodology” section. The most significant results should be described. Text, tables, and figures should not be repetitive. Statistically relevant results should be presented with enclosed corresponding p values.

**Tables:** must be numbered and cited consecutively in the main text, in Arabic numerals. Tables must be submitted separately from the text in DOC, DOCX, or format (they can be gathered in a single file).

**Discussion:** This must should discuss the study results in relation to the work hypothesis and relevant literature. It should describe the similarities and differences of the study in relation to similar studies found in literature, and provide explanations for the possible differences found. It must also identify the study's limitations and make suggestions for future research.

**Conclusions:** must be presented in a concise manner and be strictly based on the results obtained in the research. Detailing of results, including numerical values, etc., must not be repeated.

**Acknowledgments:** Contributions by colleagues (technical assistance, critical comments, etc.) must be given, and any bond between authors and companies must be revealed. This section must describe the research funding source(s), including the corresponding process numbers.

**References:** Only publications from peer-reviewed journals will be accepted as references.

Reference citations must be identified in the text with superscript Arabic numerals. The complete reference list must be presented after the "Acknowledgments" section, and the references must be numbered and presented in Vancouver Style in compliance with the guidelines provided by the International Committee of Medical Journal Editors, as presented in Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>). The journal titles should be abbreviated according to the List of Journals Indexed in Index Medicus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>). The authors shall bear full responsibility for the accuracy of their references.

**Spelling of scientific terms:** When first mentioned in the main text, scientific names (binomials of microbiological, zoological, and botanical nomenclature) must be written out in full, as well as the names of chemical compounds and elements.

**Units of measurement:** These must be presented according to the International System of Units (<http://www.bipm.org> or <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/unidLegaisMed.asp>).

**Footnotes on the main text:** These must be indicated by asterisks and restricted to the bare minimum.

**Figures:** Photographs, microradiographs, and radiographs must be at least 10 cm wide, have at least 500 dpi of resolution, and be provided in TIFF format. Charts, drawings, layouts, and other vector illustrations must be provided in a PDF format. All the figures must be submitted individually in separate files (Figure 1a, Figure 1b, Figure 2...) and not inserted into the text file.

Figures must be numbered and consecutively cited in the main text in Arabic numerals. Figure legends should be inserted together at the end of the text, after the references.

## Characteristics and layouts of types of manuscripts

### Original Research

Limited to 30,000 characters including spaces (considering the introduction, methodology, results, discussion, conclusion, acknowledgments, tables, references, and figure legends). A maximum of 8 (eight) figures and 40 (forty) references will be accepted. The abstract can contain a maximum of 250 words.

### Layout

- Title Page
- Main text (30,000 characters including spaces)
- Abstract: a maximum of 250 words
- Keywords: 3 (three)-5 (five) main descriptors
- Introduction
- Methodology
- Results
- Discussion
- Conclusion
- Acknowledgments
- References: maximum of 40 references
- Figure legends
- Figures: a maximum of 8 (eight) figures, as described above
- Tables.

### Short Communication

Limited to 10,000 characters including spaces (considering the introduction, methodology, results, discussion, conclusion, acknowledgments, tables, references, and figure legends). A

maximum of 2 (two) figures and 12 (twelve) references will be allowed. The abstract can contain a maximum of 100 words.

### **Layout**

- Title page
- Main text (10,000 characters including spaces)
- Abstract: a maximum of 100 words
- Descriptors: 3 (three)-5 (five) main descriptors
- Introduction
- Methodology
- Results
- Discussion
- Conclusion
- Acknowledgments
- References: a maximum of 12 references
- Figure legends
- Figures: a maximum of 2 (two) figures, as described above
- Tables.

### **Critical Review of Literature**

The submission of this type of manuscript will be performed only by invitation of the BOR Publishing Commission. All manuscripts will be submitted to peer-review. This type of manuscript must have a descriptive and discursive content, focusing on a comprehensive presentation and discussion of important and innovative scientific issues, with a limit of 30,000 characters including spaces (considering the introduction, methodology, results, discussion, conclusion, acknowledgments, tables, references, and figure legends). It must include a clear presentation of the scientific object, logical argumentation, a methodological and theoretical critical analysis of the studies, and a summarized conclusion. A maximum of 6 (six) figures and 50 (fifty) references is permitted. The abstract must contain a maximum of 250 words.

### **Layout**

- Title page
- Main text (30,000 characters including spaces)
- Abstract: a maximum of 250 words
- Keywords: 3 (three)-5 (five) main descriptors
- Introduction
- Methodology

- Results
- Discussion
- Conclusion
- Acknowledgments
- References: maximum of 50 references
- Figure legends

### **Layout**

- Figures: a maximum of 6 (six) figures, as described above
- Tables.

### **Systematic Review and Meta-Analysis**

While summarizing the results of original studies, quantitative or qualitative, this type of manuscript should answer a specific question, with a limit of 30,000 characters, including spaces, and follow the Cochrane format and style ([www.cochrane.org](http://www.cochrane.org)). The manuscript must report, in detail, the process of the search and retrieval of the original works, the selection criteria of the studies included in the review, and provide an abstract of the results obtained in the reviewed studies (with or without a meta-analysis approach). There is no limit to the number of references or figures. Tables and figures, if included, must present the features of the reviewed studies, the compared interventions, and the corresponding results, as well as those studies excluded from the review. Other tables and figures relevant to the review must be presented as previously described. The abstract can contain a maximum of 250 words.

### **Layout**

- Title page
- Main text (30,000 characters including spaces)
- Abstract: a maximum of 250 words
- Question formulation
- Location of the studies
- Critical Evaluation and Data Collection
- Data analysis and presentation
- Improvement
- Review update
- References: no limit on the number of references

### **Layout - Graphic Files**

- Figures: no limit on the number of figures



- Tables.

### **Letter to the Editor**

Letters must include evidence to support an opinion of the author(s) about the scientific or editorial content of the BOR, and must be limited to 500 words. No figures or tables are permitted.

### **"CHECKLIST" FOR INITIAL SUBMISSION**

- Title page file (Title Page, in DOC, DOCX or RTF format).
- Main text file (Main Document, manuscript), in DOC, DOCX or RTF format.
- Tables, in DOC, DOCX or EXCELL format.
- Figures: Photographs, micrographs and radiographs (minimum width of 10 cm and minimum resolution of 500 DPI) in TIFF format. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/pub/filespec-images/>). Graphics, drawings, diagrams and other vector illustrations in PDF format. Each figure must be submitted in separate and individual files (not included in the text file).
- Declaration of interests and funding, submitted in a separate document and in PDF format.

### **Copyright transfer agreement and responsibility statements**

The manuscript submitted for publication must include the Copyright Transfer Agreement and the Responsibility Statements, available in the online system and mandatory.

### **Plagiarism**

**BOR** employs a plagiarism detection system. When sending your manuscript to the Journal, this manuscript can be traced. This is not related to the simple repetition of names/affiliations, but involves phrases or texts used.

### **Publication fees**

Authors are not required to pay for the submission or review of articles.

## **EXAMPLES OF REFERENCES**

### **Journals**

Bhutta ZA, Darmstadt GL, Hasan BS, Haws RA. Community-based interventions for improving perinatal and neonatal health outcomes in

developing countries: a review of the evidence. *Pediatrics*. 2005;115(2 Suppl):519-617. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-1441>

### **Articles with title and text in a language other than English**

Li YJ, He X, Liu LN, Lan YY, Wang AM, Wang YL. [Studies on chemical constituents in herb of *Polygonum orientale*]. *Zhongguo Ahong Yao Za Zhi*. 2005 Mar;30(6):444-6. Chinese.

### **Supplements or Special Editions**

Pucca Junior GA, Lucena EHG, Cawahisa PT. Financing national policy on oral health in Brazil in the context of the Unified Health System. *Braz Oral Res*. 2010 Aug;24 Spec Iss 1:26-32.

### **Books**

Stedman TL. *Stedman's medical dictionary: a vocabulary of medicine and its allied sciences, with pronunciations and derivations*. 20th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1961.

### **Online Books**

Foley KM, Gelband H, editors. *Improving palliative care for cancer* [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>

### **Websites**

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>  
Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage]. Brasília (DF): Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2010 [cited 2010 Nov 27]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/home/default.php>

World Health Organization [homepage]. Geneva: World Health Organization; 2011 [cited 2011 Jan 17]. Available from: <http://www.who.int/en/>