

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA COM ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM
CLÍNICA INTEGRADA
TALITA RIBEIRO TENÓRIO DE FRANÇA

**EFEITO DO ZOLENDRONATO EM LESÕES PERIAPICAIS: UM ESTUDO
EXPERIMENTAL EM RATOS**



Recife – PE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA COM ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM
CLÍNICA INTEGRADA
TALITA RIBEIRO TENÓRIO DE FRANÇA

**EFEITO DO ZOLENDRONATO EM LESÕES PERIAPICAIS: UM ESTUDO
EXPERIMENTAL EM RATOS**

Tese apresentada ao Colegiado da Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Recife – PE

2014

Catálogo na fonte
Bibliotecária Gláucia Cândida, CRB4-1662

F814e França, Talita Ribeiro Tenório de.
Efeito do zolendronato em lesões periapicais: um estudo experimental em ratos / Talita Tenório de França. – Recife: O autor, 2014.
90f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Danyel Elias da Cruz.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Pós-graduação em Odontologia, 2014.
Inclui referências e anexos.

1. Difosfanatos. 2. Osteonecrose da Arcada Osseodentária Associada a Bisfosfonatos. 3. Doenças da Polpa Dentária. I. Cruz, Danyel Elias da (Orientador). II. Título.

617.6 CDD (22.ed.) UFPE (CCS2014-181)

ATA DA DÉCIMA SÉTIMA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

Às nove horas e quinze minutos do dia 27 do mês de fevereiro do ano de dois mil e quatorze, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública, a Comissão Examinadora para avaliar o Trabalho da Doutoranda **TALITA RIBEIRO TENÓRIO DE FRANÇA**, candidata ao Grau de Doutor em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada, os membros da Banca Examinadora, composta pelos professores: Prof. Dr. DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ, da Universidade Federal de Pernambuco, atuando como Presidente, Prof. Dr. PAULO ROGÉRIO FERRETI BONAN, da universidade Federal da Paraíba, como primeiro examinador, Prof. Dr. FRANCISCO CARLOS AMANAJÁS DE AGUIAR JÚNIOR, da Universidade Federal de Pernambuco, como segundo examinador, Profa. Dra. ANDRÉA DOS ANJOS PONTUAL, da Universidade de Pernambuco, como terceiro examinador, Prof.ª Dra. MARIA LUIZA DOS ANJOS PONTUAL, da Universidade Federal de Pernambuco, como quarto examinador, A sessão foi aberta pela Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO, Vice - Coordenadora do Programa de Pós- Graduação em Odontologia, fez as apresentações e compôs a Banca Examinadora, agradeceu a presença de todos. Iniciando convidou a Doutoranda **TALITA RIBEIRO TENÓRIO DE FRANÇA**, sob a orientação do Prof. Dr. DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ, para iniciar sua apresentação, sendo comunicado que conforme consta das normas a candidata teria trinta minutos para exposição. A doutoranda iniciou a apresentação do seu trabalho intitulado: **"EFEITO DO ZOLENDRONATO EM LESÕES PERIAPICAIS: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS"**. Concluída a apresentação, a Banca Examinadora compôs a mesa e foi dado início a arguição. Após o término das arguições os examinadores reuniram-se em secreto para deliberações formais. Ao término da discussão, atribuíram a candidata os seguintes conceitos: Prof. Dr. PAULO ROGÉRIO FERRETI BONAN, (APROVADA), Prof. Dr. FRANCISCO CARLOS AMANAJÁS DE AGUIAR JÚNIOR, (APROVADA), Profa. Dra. ANDREA DOS ANJOS PONTUAL, (APROVADA), Profa. Dra. MARIA LUIZA DOS ANJOS PONTUAL, (APROVADA), Prof. Dr. DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ, (APROVADA), a candidata recebeu por unanimidade o conceito (APROVADA) é considerada (APROVADA), devendo a mesmo acatar as sugestões da Banca Examinadora, face a aprovação, fica a candidata, apta a receber o Grau de Doutor em Odontologia desde que tenha cumprido as exigências estabelecidas de acordo com o Regimento Interno do Curso, cabendo a Universidade Federal de Pernambuco através de sua Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação, tomar as providências cabíveis. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Banca Examinadora encerrou a sessão e para constar foi lavrada a presente ata que vai por mim assinada, Ozicleire Sena de Araújo e pelos demais componentes da Banca Examinadora e pela recém formada Doutora pela UFPE. **TALITA RIBEIRO TENÓRIO DE FRANÇA**.

Recife, 27 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ
Presidente

Doutoranda:

Prof. Dr. PAULO ROGÉRIO FERRETI BONAN
1º Examinador

Prof. Dr. FRANCISCO CARLOS AMANAJÁS DE AGUIAR JÚNIOR
2º Examinador

Profa. Dra. ANDRÉA DOS ANJOS PONTUAL
3º Examinador

Profa. Dra. MARIA LUIZA DOS ANJOS PONTUAL
4º Examinador

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR DA PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

COORDENADOR DA PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MESTRADO EM CLÍNICA INTEGRADA

COLEGIADO

MEMBROS PERMANENTES

Profa. Dra. Alessandra Albuquerque T. Carvalho

Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes

Prof. Dr. Arnaldo de França Caldas Junior

Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar

Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Prof. Dr. Edvaldo Rodrigues de Almeida

Profa. Dra. Flavia Maria de Moraes Ramos Perez

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

Profa. Dra. Liriane Baratella Evêncio

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Prof. Dra. Maria Luiza dos Anjos Pontual

Prof. Dr. Paulo Sávio Angeiras Goes

Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira

Profa. Dra. Silvia Regina Jamelli

Prof. Dra. Simone Guimaraes Farias Gomes

Prof. Dr. Tibério César Uchoa Matheus

MEMBROS COLABORADORES

Prof. Dr. Cláudio Heliomar Vicente da Silva

Profa. Dra. Lúcia Carneiro de Souza Beatrice

SECRETARIA

Oziclere Sena de Araújo

Dedico este trabalho aos meus pais, Edeones Tenório de França e Maria da Penha Ribeiro de França, por todo amor, carinho e educação que me fornecem há 30 anos, amor incondicional que não vê limites e não mede esforços para agradar quem amam. Obrigada meus pais, sem a ajuda de vocês, esse momento não seria possível. Amo vocês!

Ainda dedico este trabalho ao meu esposo Dreyfus Diogenes de Lima, por todo companheirismo, apoio, amizade, paciência e amor. Amar alguém quando tudo é muito simples e a vida parece não ter problemas é muito fácil, mas amor assim igual ao nosso, que ultrapassa obstáculos e dificuldades, esse sim é o amor duradouro e que traz felicidade eterna. Obrigada por me mostrar o verdadeiro significado do amor. Sem você ao meu lado tudo seria mais difícil. Eu te amo!



AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter sempre me iluminado e abençoado a minha vida, tornando possível a realização de mais um sonho.

Aos meus irmãos, **Thalys Ribeiro Tenório de França** e **Tarcísio Ribeiro Tenório de França**, e toda minha família, pela presença constante em minha vida e por toda amizade e amor fornecido.

Ao meu orientador, **Danyel Elias da Cruz Perez**, por todos os ensinamentos oferecidos, pela paciência e interesse em transmitir seus conhecimentos aos alunos. Deus lhe deu o dom da docência e você realmente sabe usar esse presente muito bem. Suas pesquisas, projetos, trabalhos e aulas mostram realmente a sua inteligência e sua capacidade profissional. Obrigada meu querido mestre!

Ao médico veterinário, **Edeones Tenório de França**, por toda dedicação ao cuidado com os animais. Obrigada por toda ajuda e conhecimentos transmitidos. Sem seu trabalho, esta pesquisa não aconteceria.

A todos os outros **professores do curso de Pós-Graduação da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)**, que compartilharam conosco seus conhecimentos e sempre exigiram o melhor de nós.

A todos os colegas de turma, **Bruna, Felipe, Catarina, Thaís, Cláudia, Gilberto, Leogenes, Irani, Élvia, Paulo Henrique, Leonardo, Daene, Breno, Igor e Andreza** pelos inúmeros momentos vividos e compartilhados dentro e fora da UFPE.

À secretária **Oziclere** por toda dedicação e trabalho prestado e que tanto nos ajuda com carinho. Muito obrigada por tudo!

A todos os **funcionários** da UFPE pela colaboração e ajuda durante o doutorado.

Aos **animais**, que forneceram sua vida em prol da ciência, meu respeito e agradecimento.

E a **todos** aqueles que, de alguma forma, direta ou indireta, colaboraram, ajudaram e me apoiaram ao longo desses quatro anos de doutorado, tornando possível a conclusão de mais esta etapa em minha vida.



RESUMO

Introdução: Os principais fatores de risco locais para o desenvolvimento da osteonecrose associada ao uso bisfosfonatos (OABF) são a extração dentária e a presença de doença periodontal. Lesões periapicais crônicas são comuns na clínica odontológica, mas ainda não está totalmente esclarecido se a presença destas lesões pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de OABF. O objetivo deste estudo foi determinar se lesões periapicais são fatores de risco para o desenvolvimento de osteonecrose em animais tratados com zolendronato. **Métodos:** Foram utilizados 40 ratos Wistar machos. Para induzir lesões periapicais, as polpas dos primeiros molares inferiores foram expostas usando uma broca esférica ½ acoplada a um motor de alta rotação. Em seguida, foram formados 8 grupos com 5 animais em cada um: G1- indução da lesão periapical (LP) e a administração intraperitoneal semanal (AIS) de solução salina (NaCl 0,9 %) durante 4 semanas; G2- indução LP e AIS de zolendronato (0,15 mg/kg/semana) durante 4 semanas; G3- indução da LP e AIS de solução salina por 8 semanas; G4- indução da LP e AIS de zolendronato por 8 semanas; G5- AIS de solução salina durante 4 semanas e posterior indução da LP; G6- AIS de zolendronato durante 4 semanas e posterior indução da LP; G7- AIS de solução salina durante 8 semanas e posterior indução da LP; G8- AIS de zolendronato durante 8 semanas e posterior indução da LP. Para mensurar o tamanho da LP foram realizadas tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC). Também foi realizada uma análise histomorfológica para determinar a intensidade do infiltrado inflamatório e a presença de necrose óssea. As análises estatísticas usadas foram o teste ANOVA e o Kruskal-Wallis. **Resultados:** Os grupos tratados com zolendronato mostraram tamanho da LP significativamente menor que o grupo tratado com NaCl 0,9% ($p < 0,05$). As lesões periapicais eram compostas por inflamação crônica variando de leve a moderada, sem diferença entre os grupos. Não foi observada necrose mandibular em todas as amostras analisadas. **Conclusão:** A presença de LP não representa um fator de risco importante para o desenvolvimento de OABF. Além disso, o tratamento com zolendronato não alterou a população de células de LP.

Palavras-chave: Bisfosfonatos. Osteonecrose Associada a Bisfosfonatos. Doenças da Polpa Dentária.



ABSTRACT

Introduction: The main local risk factors for the development of bisphosphonates related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) are tooth extraction and the presence of periodontal disease. Chronic periapical lesions are common in dental practice, but is not yet fully clear whether the presence of these lesions may be a risk factor for the development of BRONJ. The aim of this study was to determine if periapical lesions are risk factors to the development of osteonecrosis in animals treated with zolendronate. **Methods:** It was used 40 male Wistar rats. To induce periapical lesions, the pulps of first mandibular molars were exposed using a ½ round bur on a high-speed handpiece with water coolant. Then, 8 groups were formed with 5 animals in each one.: G1- induction of periapical lesion (PL) and weekly intraperitoneal administration (WIPA) of saline solution (NaCl 0.9%) for 4 weeks; G2 - PL induction and WIPA zolendronate (0.15 mg/kg/week) for 4 weeks; G3- PL induction and WIPA of saline solution for 8 weeks; G4- PL induction and WIPA of zolendronate for 8 weeks; G5- WIPA of saline solution for 4 weeks and subsequent PL induction; G6- WIPA of zolendronate for 4 weeks and subsequent PL induction; G7- WIPA of saline solution for 8 weeks and subsequent PL induction; G8- WIPA of zolendronate for 8 weeks and subsequent PL induction. To measure the size of the PL, CBCT were performed. A histomorphological analysis was also performed to determine the intensity of the inflammatory infiltrate and the presence of bone necrosis. Statistical analyzes used were ANOVA and Kruskal-Wallis test. **Results:** The groups treated with zolendronate showed significantly smaller size of the PL than the group treated with NaCl 0.9% ($p < 0.05$). PL were formed by chronic inflammation ranging from mild to moderate, with no difference between groups. There was no mandibular necrosis in all specimens analyzed. **Conclusion:** The presence of chronic periapical lesions apparently does not represent an important risk factor for the development of BRONJ. Furthermore, treatment with zolendronate did not alter the cell population of chronic periapical lesions.

Key words: Bisphosphonates. Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw. Dental Pulp Diseases.



LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do ácido pirofosfórico (Fonte: Reszka ¹⁸)	23
Figura 2: Estrutura química dos bisfosfonatos (Fonte: Rezska ¹⁸)	24
Figura 3: Estrutura química dos bisfosfonatos não nitrogenados (Fonte: Reszka ¹⁸).24	
Figura 4: Estrutura química dos bisfosfonatos nitrogenados (Fonte: Reszka ¹⁸).....	24
Figura 5: Ação molecular do bisfosfonato. Ele age inibindo a expressão de RANKL e induzem os osteoblastos a produzirem OPG (Fonte: Morote; Planas ²⁶).	25
Figura 6: Apresentação clínica da OABF	28
Figure 1: Coronal section with 0.2mm thick showing the measurement of the periapical lesion in a specimen of G3.	64
Figure 2: Coronal reconstruction with 0.2 mm thick. Red arrows indicate periapical lesion in G1 (A), G2 (B), G4 (C), G5 (D), G6 (E) and G8 (F).	65
Figure 3: Histological findings in periapical region. (A) Group 1 (B) Group 2 and (C) Group 3 showing slight inflammatory infiltrate (hematoxylin and eosin, original magnification, x40 and x100). (D) Specimen from Group 7 shows a moderate inflammatory infiltration (hematoxylin and eosin, original magnification, x200).	66



LISTA DE TABELAS

Table 1 - Mean size of the periapical lesions and analysis of matching control and experimental groups.....	63
---	----



LISTA DE ABREVIATURAS

BF	Bisfosfonato
P	Fosfato
C	Carbono
NF-kB	Fator nuclear kappa Beta
RANK	Receptor ativador do NF-kB
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa Beta
GTP	Guanosina trifosfato
GTPase	Enzima hidrolase que se liga e hidroliza a Guanosina Trifosfato
OPG	Osteoprotegerina
ATP	Adenosina trifosfato
OABF	Osteonecrose associada ao uso de bisfosfonatos
MMP	Matriz de metaloproteinase
CBCT	Tomografia computadorizada de feixe cônico
TCFC	Tomografia computadorizada de feixe cônico
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
G3	Grupo 3
G4	Grupo 4
G5	Grupo 5
G6	Grupo 6
G7	Grupo 7
G8	Grupo 8
PL	Lesão periapical
WIPA	Administração intraperitoneal semanal
NaCl	Cloreto de sódio
Mg	Miligrama
Kg	Quilograma
BRONJ	Osteonecrose dos maxilares associada aos bisfosfonatos
BP	Bisfosfonato
PPI	Pirofosfato inorgânico
O	Oxigênio
Ca ²⁺	Íon cálcio
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
G	Grama
Kv	Kilovolts
mA	Miliamper
Mm	Milímetro
EDTA	Ácido ethylenediaminetetracético
HE	Hematoxilina-eosina
µg	Micrograma
PL	Lesão periapical

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 <i>Estrutura molecular e mecanismo de ação dos bisfosfonatos</i>	23
2.2 <i>Indicações terapêuticas</i>	26
2.3 <i>Características clínicas, radiográficas e histológicas da OABF</i>	27
2.4 <i>Fatores de risco</i>	31
2.5 <i>Lesões periapicais e OABF</i>	40
3. OBJETIVO	46
3.1 <i>Objetivos específicos</i>	46
4. EFFECTS OF THE ZOLENDRONATE IN PERIAPICAL LESIONS AND SURROUNDING ALVEOLAR BONE IN A MURINE MODEL.	48
4.1 <i>Introduction</i>	48
4.2 <i>Methods</i>	49
4.3 <i>Results</i>	51
4.4 <i>Discussion</i>	53
4.5 <i>Conclusion</i>	57
4.6 <i>Acknowledgments</i>	57
4.7 <i>References</i>	58
4.8 <i>Table</i>	63
4.9 <i>Figures</i>	64
5. CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	70
ANEXOS	83
<i>Anexo A</i>	83
<i>Anexo B</i>	90



1. INTRODUÇÃO

Os Bisfosfonatos (BFs) são análogos do ácido pirofosfórico e contêm em sua estrutura uma ligação P-C-P. Essas drogas têm alta afinidade pelo tecido ósseo e atuam inibindo a atividade dos osteoclastos e a reabsorção óssea^{1, 2, 3}. Devido a sua capacidade de inibir a reabsorção óssea, os BFs são utilizados no tratamento de doenças ósseas, tais como: doença de Paget, osteoporose, osteopenia, hipercalcemias associadas a doenças malignas, mieloma múltiplo e metástases ósseas^{2,4}.

Apesar do uso dos BFs ser bastante importante no tratamento dessas doenças, eles apresentam efeitos colaterais sistêmicos e locais^{5, 6, 7}. Com relação aos efeitos adversos locais, a maior complicação relatada na literatura é a osteonecrose associada ao uso de bisfosfonatos (OABF)⁸. Esta é uma condição caracterizada pela presença de osso exposto na região maxilo-facial, que não cicatriza há 8 semanas, presente em pacientes que tem um histórico de uso de BFs e que não foram submetidos a tratamento radioterápico^{5, 9, 10}.

Vários estudos têm demonstrado alguns fatores de risco significantes para o desenvolvimento da OABF, tais como: o tipo de administração, tempo de uso da droga e procedimentos dentais invasivos^{6, 11, 12}. As exodontias estão entre os principais fatores de risco locais. No entanto, apesar de alguns fatores de risco já estarem bem estabelecidos na literatura, outros ainda não foram bem elucidados. Evidência de lesões periapicais agindo como fator de risco ainda é limitada. A ação inibitória do BF na remodelação óssea pode interferir no processo de desenvolvimento, progressão e reparo de lesões periapicais, durante e após o tratamento endodôntico¹³. No entanto, ainda não está claro o efeito que o BF tem

nessas lesões e o comportamento dessas lesões em pacientes que fazem uso dessa droga.

Modelos animais têm sido utilizados com o objetivo de avaliar se as lesões periapicais são fatores de risco para o desenvolvimento de OABF. Xiong et al.¹⁴ analisaram os efeitos da administração do alendronato (bisfosfonato de administração oral) no processo de reabsorção do osso alveolar em ratos com lesões periapicais. Eles observaram que a administração do bisfosfonato inibiu a reabsorção óssea associada à lesão periapical, no entanto, eles não diagnosticaram úlceras ou osteonecrose. Já Kang et al.¹⁵ avaliaram o efeito do zolendronato em lesões periapicais de ratos e observaram que estas lesões foram maiores nos animais tratados com o bisfosfonato e também identificaram casos de OABF.

Sendo assim, esta revisão da literatura foi desenvolvida com o objetivo de analisar as implicações clínicas dos BFs na odontologia, principalmente no tratamento endodôntico, e avaliar o potencial de lesões periapicais como fatores de risco para OABF.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão da literatura tem o objetivo de proporcionar um embasamento teórico e científico sobre os bisfosfonatos, explicando as estruturas químicas, mecanismos de ação, indicações terapêuticas, aplicabilidade clínica e principais efeitos colaterais dessas drogas.

2.1 Estrutura molecular e mecanismo de ação dos bisfosfonatos

Os BFs são análogos do pirofosfato no qual o átomo central de oxigênio é substituído por um de carbono (Figura 1). O ácido pirofosfórico não pode ser utilizado como medicamento, pois sofre uma rápida hidrólise enzimática. Essa troca do átomo de oxigênio pelo de carbono torna o BF mais resistente à degradação enzimática e a sua meia-vida biológica fica maior, possibilitando seu uso como agente terapêutico¹⁶. O tempo de meia vida do BF no plasma é de poucas horas, mas no osso pode durar cerca de 10 anos¹⁷.

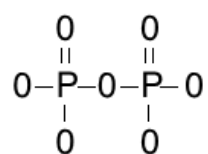


Figura 1: Estrutura química do ácido pirofosfórico (Fonte: Reszka¹⁸)

Os BFs têm na sua estrutura química dois grupos fosfato ligados ao átomo central de carbono (P-C-P) e duas cadeias laterais (R' e R'') também ligadas ao átomo de carbono (Figura 2). O grupo R1 fornece a afinidade dos BFs pelos cristais ósseos, enquanto o grupo R2 é responsável pela sua potência e atividade farmacológica¹⁹.

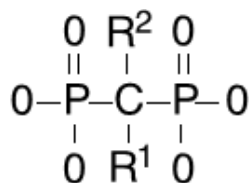


Figura 2: Estrutura química dos bisfosfonatos (Fonte: Rezska¹⁸)

Assim como o pirofosfato, os BFs se ligam aos cristais de hidroxiapatita e esta ligação confere grande afinidade às estruturas ósseas. Uma vez ligados ao osso, os BFs inibem a reabsorção óssea e permanecem não metabolizados por longos períodos de tempo^{1-3, 8, 20}.

Os BFs são divididos em dois grupos: bisfosfonatos não nitrogenados (etidronato, clodronato e tiludronato- Figura 3) e os nitrogenados (alendronato, pamidronato, ibandronato, risedronato e zolendronato- Figura 4). Pamidronato e zolendronato são administrados por via intravenosa e os outros seis são administrados por via oral²¹.

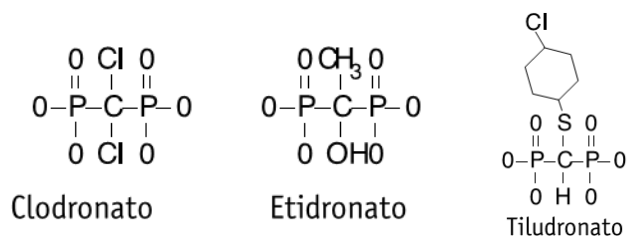


Figura 3: Estrutura química dos bisfosfonatos não nitrogenados (Fonte: Reszka¹⁸)

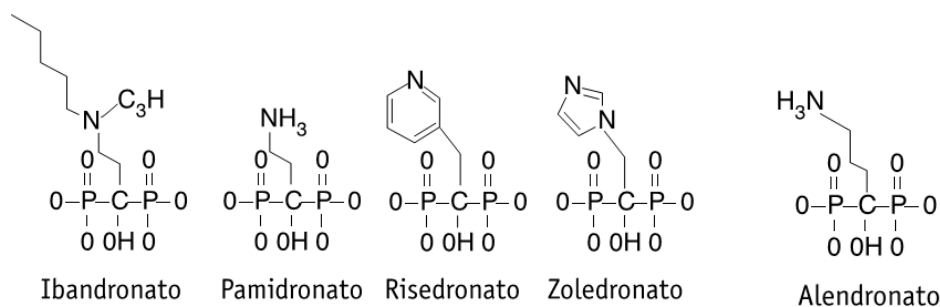


Figura 4: Estrutura química dos bisfosfonatos nitrogenados (Fonte: Reszka¹⁸)

O efeito dos BFs no tecido é a inibição da reabsorção óssea e a redução do turnover ósseo²². Seus efeitos a nível celular são a diminuição do recrutamento e proliferação dos osteoclastos. Durante o turnover ele é fagocitado pelos osteoclastos, inibindo a atividade osteoclástica na superfície do osso, muda a morfologia celular, diminui a vida útil dos osteoclastos e induz a apoptose²³.

Os BFs também agem molecularmente pela interação com o receptor de superfície da célula. Em condições normais, os osteoclastos controlam o recrutamento dos osteoblastos e ativação através da interação do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa Beta (NF- κ B) (RANKL) com o receptor ativador do NF- κ B (RANK), presente nos osteoclastos. Os BFs agem inibindo a expressão de RANKL e induzem os osteoblastos a produzirem osteoprotegerina (OPG), fator que compete com RANKL pelo RANK (Figura 5). A indução de OPG leva a uma diminuição da atividade osteoclástica^{24, 25}.

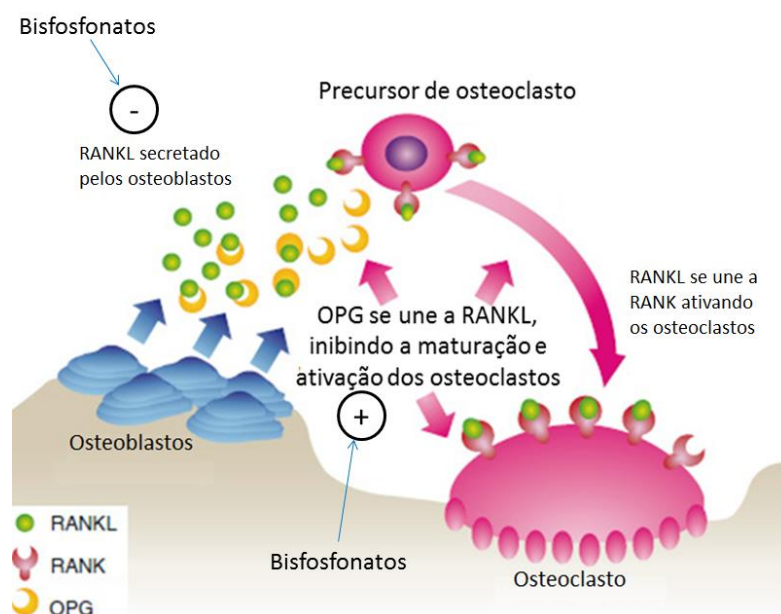


Figura 5: Ação molecular do bisfosfonato. Ele age inibindo a expressão de RANKL e induzem os osteoblastos a produzirem OPG (Fonte: Morote; Planas²⁶).

Os BFs não nitrogenados induzem a apoptose dos osteoclastos devido a sua similaridade com pirofosfato. Eles são metabolicamente incorporados a análogos

não hidrolisados da ATP (adenosina trifosfato) e são acumulados nos osteoclastos, induzindo a apoptose¹. O mecanismo de ação dos nitrogenados é baseado na inibição de uma pequena GTPase (enzima hidrolase que se liga e hidrolisa o GTP) que é importante na função osteoclástica, a enzima farnesil pirofosfato sintase, na via do mevalonato, que atua na biossíntese do colesterol catalisando a conversão do geranyl pirofosfato em farnesil pirofosfato. A inibição da farnesil pirofosfato sintase leva a uma diminuição da ativação de proteínas intracelulares sinalizadoras. O resultado nos osteoclastos são a redução de sua atividade e aumento de seu índice de apoptose²⁷. Recentemente, estudos têm mostrado que os BFs também interferem no processo de angiogênese através da inibição da proliferação e migração de células endoteliais e redução da revascularização^{2,28}.

2.2 Indicações terapêuticas

Os BFs têm sido largamente utilizados no tratamento de doenças ósseas por causa da sua habilidade de inibir reabsorção óssea. São utilizados para tratar osteoporose, osteopenia, doença de Paget e osteogênese imperfeita em crianças²⁹⁻³³. Os BFs administrados intravenosamente são usados para tratar condições relacionadas à terapia de câncer, tais como: metástases ósseas, hipercalcemias malignas, mieloma múltiplo^{5,21,34,35}.

A alteração na homeostase óssea causada pelos BFs pode levar a sérios efeitos adversos²¹. Apesar dos BFs terem efeitos clínicos satisfatórios, muitas complicações por causa do seu uso têm sido relatadas, principalmente nos pacientes que fazem uso de BFs intravenosos. Os principais efeitos colaterais dos BFs são: intolerância gastrointestinal, dor de cabeça, hipocalcemia, hipofosfatemia,

dor nos ossos, febre, aumento da creatinina, hipercolesterolemia, tontura, fadiga, náusea, hipertensão, parestesia, dor no peito, edema, rinite, sinusite, dor abdominal⁸. Recentemente, complicações orais têm sido observadas. Marx⁹ descreveu o primeiro caso de complicação oral associada ao uso de BFs, chamada de osteonecrose associada ao uso de BF (OABF).

A Sociedade Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais define OABF como uma condição caracterizada pela presença de osso exposto na região maxilofacial por um período de 8 semanas, com uma história prévia de tratamento com BFs e ausência de história de radioterapia dos maxilares¹⁰. Geralmente, OABF ocorre mais frequentemente na mandíbula que na maxila. A mandíbula é mais acometida provavelmente por causa da sua anatomia, características fisiológicas do seu osso e efeito anti-angiogênico do BF³⁶⁻³⁸. Os maxilares têm um grande suprimento sanguíneo e uma rápida taxa de turnover ósseo e, por causa da sua remodelação óssea diária, os BFs ficam altamente concentrados nesses ossos. Além disso, doenças dentárias invasivas e tratamento odontológico podem contribuir para a concentração anatômica dos BFs³⁹.

2.3 Características clínicas, radiográficas e histológicas da OABF

O osso exposto se apresenta não vital, os tecidos moles ao redor apresentam-se eritematosos e inflamados⁷. A queixa mais comum é dor ou pode ser assintomática, podendo ocorrer também inchaço dos tecidos, infecção, drenagem e mobilidade dentária^{7,9}.

De acordo com suas características clínicas, a OABF pode ser dividida em 4 estágios. No estágio 0, não há osso exposto visível ou osso necrótico. No estágio 1,

os pacientes são assintomáticos mas há infecção e osso exposto/necrótico. Pacientes no estágio 2 têm osso exposto/necrótico, infecção e são sintomáticos, apresentando dor e eritema, com drenagem purulenta ou não. Finalmente, no estágio 3 há exposição/necrose óssea, dor, infecção e pode ocorrer fraturas patológicas e fístula extra-oral^{7,40} (Figura 6).



Figura 6: Apresentação clínica da OABF

As imagens radiológicas são ferramentas muito importantes do diagnóstico de OABF. Os achados radiológicos fornecem valiosas informações para o clínico que diz respeito ao desenvolvimento, a magnitude e a progressão da doença. Radiografias panorâmicas, radiografia periapical, tomografia computadorizada, ressonância magnética e cintilografia óssea estão entre as modalidades de imagem que podem ser utilizados para ajudar a identificar a extensão da doença, orientar opções terapêuticas, e monitorizar a resposta ao tratamento⁴¹. Esses achados radiográficos variam desde uma área de OABF até áreas de osso normal. Pode ser observada esclerose óssea, áreas líticas, sequestro ósseo e espessamento da lâmina dura. Às vezes, alterações ósseas podem não ser observadas^{5,39,41,42}.

Chiandussi et al.⁴³ avaliaram as características imaginológicas de 11 pacientes com OABF. Através da radiografia panorâmica, eles observaram áreas de destruição óssea, áreas radiolúcidas irregulares, com evidência sequestro radiopaco

e necrose óssea. A avaliação por meio da tomografia computadorizada revelou imagens com uma moderada irregularidade das margens corticais, destruição do osso cortical e áreas claras de osteólise e osteosclerose.

Hutchinson et al.⁴⁴ avaliaram 30 pacientes com OABF. Dentre esses pacientes, 10 tinham estágio 0 da doença com características radiográficas semelhantes de osteosclerose regional ou difusa em áreas clinicamente sintomáticas, a maioria com extensão para além da local envolvido. Também observaram confluência densidade da cortical e osso esponjoso, proeminência do canal do nervo alveolar inferior, lâmina dura espessada e esclerótica, áreas periradiculares com radiolucência uniformes, perda da continuidade cortical, falta de preenchimento ósseo após a extração do dente.

A tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) também tem sido utilizada para caracterizar lesões ósseas e descrever a extensão e envolvimento de estruturas adjacentes nos casos de OABF. Olutayo et al.⁴⁵ analisaram 20 pacientes que apresentaram OABF e descreveram alguns achados radiológicos. Através da TCFC eles identificaram ausência de cortical, espessamento da lâmina dura, ulceração e espessamento do osso cortical. Além disso, também detectaram presença de esclerose, destruição óssea lítica envolvendo osso alveolar e basal, com ou sem invasão do canal mandibular e fraturas mandibulares.

Wilde et al.⁴⁶ analisaram 27 tomografias de regiões com presença de OABF e observaram que a destruição do osso esponjoso e erosão do osso cortical foram os achados mais comuns. Eles perceberam também que a ocorrência desses achados parece diminuir de acordo com a diminuição da gravidade da OABF. Relataram também que sequestro e osteosclerose foram os achados menos frequentes.

Ressonância magnética e cintilografia óssea também podem ser usadas no diagnóstico e avaliação da progressão da OABF. A ressonância pode ajudar na detecção de envolvimento de tecido mole. Esse exame, através do uso de contraste, permite a diferenciação entre áreas de sequestro ósseo e áreas de hiperemia. A cintilografia mostra áreas de marcação pelo radioisótopo indicando hiperatividade de osteoblasto. Pode ser observado decréscimo na atividade do radioisótopo ou falta de atividade, representando que existe baixo metabolismo no osso necrótico⁴³. Chianducci et al.⁴³ encontraram um aumento captação em todos os casos os 11 casos de OABF estudados, com 3 casos de diminuição da captação central ou adjacente à região de absorção, indicando uma falta de vascularização e atividade na região necrótica. Com relação a análise histológica, podem ser observados osteons acelulares e necróticos e uma mistura de células inflamatórias³⁹. Hansen et al.⁴⁷ fizeram uma análise histológica de amostras de pacientes com OABF e em todos os casos tecido ósseo não-vital foi encontrado. Eles observaram que as lesões OABF eram formadas por múltiplas áreas de osso necrosado e com ninhos residuais de osso vital. Infiltrados inflamatórios eram constituídos por neutrófilos, linfócitos e células plasmáticas. Em cinco de oito casos de OABF (62,4%), epitélio proliferação ocorreu nos espaços medulares cobrindo o trabeculado ósseo.

Koerdt et al.⁴⁸ avaliaram as características histológicas de 23 casos de OABF. Eles observaram em cinco casos (21,7%) uma necrose asséptica do osso, em duas (8,7%) amostras ocorreu uma necrose asséptica com uma inflamação, em parte, purulenta, e em 15 casos (65,2%) uma osteomielite purulenta com sequestro e quantidades de neutrófilos aumentadas. Ocorreu também um caso que mostrou sinais de uma inflamação crônica com tecido de granulação e infiltração de linfócitos.

A remodelação óssea pode ser encontrada em três amostras (13%) e oito amostras (34,8%) mostraram sinais de proliferação epitelial.

Alguns microrganismos podem ser identificados no osso necrosado, tal como o *Actinomyces*^{7,42,47,48}. Hansen et al.⁴⁷ encontraram colônias de *Actinomyces* em todos os casos de OABF estudados. Esses microrganismos foram encontrados ao lado do osso necrótico, que mostrou sinais notáveis de erosão e contornos em forma irregulares. No estudo de Koerdt et al.⁴⁸ dentre os 23 casos de OABF avaliados, em 18 (78,3%) eles encontraram colônias de *Actinomyces*.

2.4 Fatores de risco

A OABF pode ocorrer espontaneamente, mas existem alguns fatores que aumentam o risco para seu desenvolvimento. Os fatores de risco estão relacionados à administração de BFs, aos fatores de risco sistêmicos e fatores locais. Com relação à administração de BFs, está bem estabelecido que os BFs que contêm nitrogênio, os BFs intravenosos, longas exposições a droga e a dose administrada aumentam o risco para desenvolvimento de OABF^{40,49}.

Fatores sistêmicos também podem contribuir para a ocorrência de OABF. Pacientes com doenças malignas (câncer de mama, câncer de próstata e mieloma múltiplo) estão mais suscetíveis ao aparecimento de OABF. Algumas comorbidades sistêmicas podem aumentar esse risco, tais como: diabetes, osteoporose, câncer, uso de esteroides e agentes imunossupressores, uso de álcool e fumo^{6, 10, 50}. Recentemente, um estudo mostrou fatores genéticos como fatores de risco, tal como o polimorfismo no gene CYP2C8⁴⁹.

Fatores de risco locais têm sido largamente estudados na literatura e pesquisas têm demonstrado que uma higiene oral deficiente, cárie e doença periodontal pré-existentes podem ser considerados potenciais fatores de risco para o desenvolvimento de OABF^{12, 20, 51, 52}. Existem alguns eventos desencadeadores que podem levar a OABF: extrações dentárias, cirurgias de implantes dentários, trauma intraoral, cirurgia periapical e periodontal^{12, 52, 55}. Além disso, a anatomia local também pode contribuir para aumentar o risco de OABF, uma vez que o torus lingual e a linha milo-hióidea estão presentes na mandíbula e o torus palatino na maxila, que possuem uma mucosa de revestimento mais suscetível a traumatismos^{5, 42}.

Muitos estudos têm mostrado a associação de fatores de risco locais com o desenvolvimento da OABF. Pesquisadores têm investigado essa associação através de estudos de caso de séries e pesquisas longitudinais. Marx⁹ avaliaram 36 pacientes com OABF e observaram que 28 (77,7%) tinham sido submetidos a uma extração dentária prévia e 8 (22,3%) desenvolveram espontaneamente. Ruggiero et al.⁵ realizaram um estudo retrospectivo para analisar pacientes que utilizavam BFs e identificaram 63 pacientes com OABF. Os sintomas observados foram dor e osso exposto no local onde foi realizada a exodontia e 9 (14%) casos apresentaram exposição óssea espontânea.

Estilo et al.⁴² conduziram um estudo retrospectivo e encontraram alguns fatores estatisticamente significantes associados à OABF, tais como: duração da terapia com BFs, tratamento sequencial de BF intravenoso com pamidronato seguido de ácido zoledrônico, comorbidades como osteoartrite ou artrite reumatoide e condições hematológicas benignas. A saúde oral, cárie, doença periodontal e uso de corticoide não foram significantemente associados à OABF⁴².

Pacientes que usam os BFs têm um largo número de comorbidades, dentre elas pode-se citar: quimioterapia sistêmica, doenças malignas, uso de corticoides, periodontite e cáries³⁹. Marx et al.³⁹ fizeram uma revisão de 119 casos de OABF e eles observaram que as comorbidades orais mais prevalentes eram periodontite (84%), cáries (28,6%), abscesso dentário (13,4%). Também observaram a presença de tratamento endodôntico (10,9%) e torus mandibular (9,2%). Em 25,2% dos casos, a OABF ocorreu espontaneamente e o evento precipitante da exposição do osso foram exodontia (37,8%), periodontite avançada (28,6%), cirurgia periodontal (11,2%), implantes dentários (3,4%) e cirurgia paraendodôntica (0,8%). Cáries dentárias na área do osso exposto foram observadas em 34 casos (28,6%) e 16 (13,4%) desses casos apresentaram formação de abscesso dentário. Trinta (10,9%) dentes tinham tratamento endodôntico já realizado com evidências de falência.

Bamias et al.⁶ avaliaram 252 pacientes tratados com BFs e observaram que 17 (6,7%) desenvolveram OABF e eles afirmaram que tratamento dentário prévio, como as exodontias e o uso de próteses dentárias, pode ter sido o fator desencadeador. Bagan et al.⁵⁶ apresentaram uma série de 10 casos de osteonecrose dos maxilares que ocorreram após o tratamento de câncer. Eles observaram que em 7 (70%) pacientes com OABF uma exodontia havia sido realizada previamente.

Na literatura se observa que 40% dos casos de OABF não estão associados a algum procedimento dentário invasivo e esses casos parecem estar conectados a doenças dentais, trauma local ou variações anatômicas⁵⁷. Badros et al.⁵² avaliaram 90 pacientes com mieloma múltiplo e diagnosticaram 22 casos de OABF, sendo que 10 desses pacientes tinham sido submetidos previamente a exodontias na área

afetada, 2 tinham problemas periodontais e 10 não foram submetidos a algum procedimento odontológico prévio.

Bagan et al.⁵⁸ estudaram possíveis fatores de risco locais para OABF em 20 pacientes tratados com bisfosfonatos. Eles avaliaram o efeito da extração dentária e observaram que 11 casos de OABF ocorreram após as exodontias e os outros 9 casos ocorreram espontaneamente. Dimitrakopoulos et al.⁵⁹ conduziram um estudo no qual identificaram 11 pacientes que desenvolveram OABF, sendo que 7 desses pacientes apresentaram exposição óssea e necrose após as exodontias, em 3 a OABF ocorreu espontaneamente e em apenas 1 ocorreu após trauma crônico devido a prótese. Merigo et al.⁵⁷ estudaram 29 casos e observaram que 15 foram decorrentes de procedimentos cirúrgicos e 14 foram espontâneos. Zervas et al.⁶⁰ avaliaram 254 pacientes com mieloma múltiplo que eram tratados com BFs e observaram que 28 (11,02%) pacientes foram diagnosticados com OABF. Treze pacientes (46%) tiveram OABF após prévia exodontia e outros 3 (10,7%) pacientes tinham próteses dentárias.

Jadu et al.⁶¹ conduziram um estudo retrospectivo com 655 pacientes com mieloma múltiplo e observaram que a incidência de OABF foi 3,2%. Eles identificaram os seguintes fatores de risco: longos períodos de tratamento, extrações dentárias, uso concomitante de corticoide, baixos níveis de hemoglobina, diálise renal e idade avançada. Exodontias foram observadas em 64% dos pacientes com exposição óssea.

Marx et al.⁶² estudaram 30 casos de OABF e observaram que 15 casos (50%) ocorreram espontaneamente e outros 15 (50%) ocorreram devido a um procedimento dental invasivo. Eles relataram que uma exposição óssea espontânea (3,3%) não estava relacionada a um torus bucal, uma (3,3%) ocorreu com exposição

de um torus bucal, 12 casos (40%) resultaram de extrações dentárias, 2 casos (6,7%) desenvolveram-se como resultado de cirurgias de implante e 1 caso (3,3%) foi proveniente de um enxerto de tecido conjuntivo no palato.

Walter et al.⁶³ observaram que 13 entre 17 pacientes com OABF apresentaram como possíveis fatores desencadeantes: extrações (7 pacientes), doença periodontal (2 pacientes), lesão por pressão da prótese (1 paciente) e osteotomia (1 pacientes). Já Yarom et al.⁶⁴ conduziram um estudo retrospectivo com 98 pacientes que usavam BFs e que tiveram osteonecrose e perceberam que a OABF foi desencadeada por exodontia em 6 dentre 13 pacientes, por cirurgia de implante em 3 pacientes e por próteses mal adaptadas em 2 pacientes.

Boonyapakorn et al.⁶⁵ realizaram um estudo prospectivo com 80 pacientes que usavam BFs. Desses 80, 22 (28%) desenvolveram OABF, sendo que em 5 (23%) ela ocorreu espontaneamente e em 17 (77%) ela ocorreu após exodontia. Carmagnola et al.⁶⁶ avaliaram 20 casos de OABF e observaram que em 10 (50%) casos os pacientes foram submetidos a exodontias após eles iniciarem o uso do BF, em 3 casos (15%) a origem da OABF não pôde ser determinada. Outros fatores desencadeantes que eles observaram foram: remoção de implantes dentários (1 caso), infecção periodontal localizada (1 caso) e trauma por prótese (7 casos).

Estilo et al.¹¹ fizeram um estudo retrospectivo para categorizar os fatores de riscos associados a osteonecrose em pacientes tratados com BFs intravenosos. Entre 310 pacientes, a OABF foi diagnosticada em 28 casos durante a primeira consulta odontológica e em 7 casos ela ocorreu posteriormente. Eles observaram que cáries dentárias foram negativamente associadas com o desenvolvimento da OABF. A doença periodontal, presença sintomática de dente com comprometimento periodontal e higiene oral deficiente não foram associadas com o desenvolvimento

de OABF. A maioria dos pacientes (51,4%) tinha realizado uma exodontia prévia ou colocado um implante no local onde ocorreu a OABF e em 40% o aparecimento da OABF foi espontâneo.

Ibrahim et. al.⁶⁷ avaliaram a correlação entre os BFs e a osteonecrose dos maxilares e observaram que 8 pacientes que usavam essas drogas desenvolveram a osteonecrose. Em 4 pacientes, a osteonecrose foi diagnosticada durante o tratamento, enquanto que em outros 4 pacientes ela foi diagnosticada muitos meses após o término do tratamento. Os pacientes com OABF apresentaram vários fatores de risco, 6 pacientes tinham doença periodontal e em 6 pacientes foram observadas extrações dentárias e avulsão espontâneas do dente.

Kyrgidis et al.⁶⁸ conduziram um estudo com 20 pacientes com OABF e coletaram informações a respeito de um histórico da extração dentária, uso de próteses e tratamento endodôntico. Eles observaram que 10 pacientes tinham um histórico de exodontias, 8 pacientes usavam prótese e 4 tinham tratamento endodôntico realizado. Além disso, eles afirmaram que a história de exodontias e uso de próteses aumentaram o risco de desenvolvimento de OABF. No entanto, o tratamento endodôntico não foi significativamente associado à OABF.

Hoff et al.⁶⁹ conduziram um estudo retrospectivo com 4019 pacientes tratados com BFs e identificaram 29 casos de OABF. Suas análises identificaram fatores associados a OABF em 28 casos: exodontia (55%), doença periodontal (41%), exostose óssea (34%), trauma relacionado a intubações ou próteses (17%), implantes dentários (2,9%). Eles observaram alto acúmulo de doses de BFs, pobre higiene oral e exodontias como fatores de risco significantes para o desenvolvimento de OABF. Vieillard et al.⁷⁰ analisaram 13 casos de OABF e perceberam que em 9 (69%) pacientes as condições odontológicas eram desfavoráveis, 3 (23%) pacientes

eram edêntulos e 11 (84,6%) pacientes tinham história de extração dentária antes do diagnóstico de OABF.

Assael⁷¹ fez uma revisão da literatura e observou que o risco de OABF pode aumentar após um exodontia e esse risco é maior ainda em pacientes que fazem uso de BFs intravenoso. Ele também observou que alguns cofatores podem ser importantes, tais como: fumo, uso de esteróide, anemia, hipoxemia, diabetes, infecção e deficiência imune. Junquera et al.⁷² estudaram 21 casos de OABF e detectaram que 15 pacientes tinham realizado exodontias prévias no mesmo local onde ocorreu a exposição óssea, 2 pacientes foram submetidos a cirurgia em diferentes locais e 4 pacientes não tinham história de extração prévia mas tinham uma higiene oral deficiente.

Saussez et al.⁷³ descreveram a apresentação clínica de 34 casos de OABF e identificaram possíveis fatores de risco. Eles observaram que em 17 (50%) pacientes a OABF ocorreu após uma extração dentária. Além disso, 24 pacientes apresentaram periodontite (71%), um paciente apresentou abscesso (3%) e 9 pacientes tiveram OABF espontaneamente (26%). Vahtsevanos et al.⁷⁴ estudaram 80 pacientes com OABF e demonstraram através de análise multivariada que o uso de próteses e a realização de exodontias prévias estão associadas a um risco maior de desenvolvimento de OABF. No entanto, fumo, periodontite e tratamento endodôntico não aumentaram esse risco. Eles provaram que o risco para surgimento de OABF é 18 vezes maior em pacientes que realizam exodontias prévias. Além disso, também afirmaram que o tratamento de canal é um procedimento seguro em pacientes que fazem uso do BFs. Walter et al.⁷⁵ conduziram um estudo retrospectivo com 75 pacientes que tinham câncer de mama e observaram uma incidência de 5,3% de OABF e a exodontia foi identificada como fator de risco.

Chiu et al.⁷⁶ relataram 12 casos de OABF e observaram que 7 pacientes tinham histórico de exodontia, 1 havia realizado cirurgia pré-protética e 2 tinham trauma devido ao uso de prótese. Kos et al.⁷⁷ avaliaram 18 pacientes com OABF e observaram que em 8 casos a OABF ocorreu após exodontia, em 2 casos ocorreu após remoção cirúrgica de um cisto e em 2 casos foi após colocação de implante.

Hong et al.⁷⁸ observaram que em 15 de 24 pacientes, a extração dentária foi o evento desencadeador da OABF, em 4 de 24 pacientes o fator foi o trauma por prótese e em 5 pacientes a OABF ocorreu espontaneamente. Já Williamson⁷⁹ avaliou 40 pacientes que desenvolveram OABF e notaram que em 29 casos os pacientes não tinham história prévia de extração dentária, em 5 casos foi considerado que a OABF foi desencadeada por uma doença periodontal, 3 casos ocorreram devido a prótese mal adaptada, 2 casos aconteceram espontaneamente e 1 caso ocorreu em um paciente que tinha realizado tratamento endodôntico há mais de 5 meses. Stockmann et al.⁸⁰ avaliaram 50 casos de OABF e observaram que esta condição estava relacionada à cirurgia dentárias invasivas em 25 pacientes e nos outros 25 casos ela ocorreu sem precedentes de trauma. Em 10 pacientes, a OABF estava localizada na região que suportava a base da prótese.

Vescovi et al.⁸¹ avaliaram 567 pacientes com OABF e a dividiu em dois grupos: forma de OABF não desencadeada por cirurgia (205 pacientes) e a forma de OABF posterior a procedimentos invasivos (362 pacientes). No grupo da OABF não desencadeada por cirurgia, foi observado que em 21 casos (10,2%) um trauma por prótese estava presente no local de exposição óssea, em 4 casos (2%) a OABF foi associada a periodontite e nos casos restantes nenhum evento desencadeador foi identificado. No outro grupo, a OABF ocorreu após exodontia em 361 casos e em 1 caso após cirurgia de implante. Os autores afirmaram que geralmente a OABF

ocorre após um procedimento odontológico cirúrgico, mas eles perceberam que esta condição também pode se originar como resultado de infecções periodontais e endodônticas ou trauma local. Apesar dos estudos mostrarem que lesões relacionadas a procedimentos cirúrgicos são mais frequentes que as não relacionadas a procedimentos cirúrgicos, a quantidade da forma de OABF não desencadeada por procedimentos invasivos vem aumentando.

Manfredi et al.⁸² relataram a ocorrência de OABF em 25 pacientes tratados com BFs devido a razões não oncológicas. Eles observaram história de cirurgia oral em 18 pacientes (72%), 2 (8%) deles havia recebido um implante e 16 relataram história de exodontia prévia. Sete (28%) pacientes tiveram OABF espontaneamente, 1 (4%) tinha doença periodontal na área afetada, 12 (48%) usavam prótese removível. Concluíram que próteses podem ser consideradas como um fator desencadeante local para o desenvolvimento de OABF. Maurer et al.⁸³ observaram que entre 21 pacientes com OABF, 12 (57%) tiveram OABF espontaneamente e 9 (43%) tinham história de extração prévia.

Otto et al.⁸⁴ avaliaram 126 casos de OABF e observaram que em 63,6% casos a investigação detalhada da história médica revelou fatores desencadeantes (extrações dentárias ou extrações combinadas a tratamento endodôntico ou procedimentos periodontais) na área onde a OABF ocorreu. O’Ryan e Lo⁸⁵ identificaram 30 casos de OABF em pacientes que faziam uso de BF para tratamento de osteoporose/osteopenia. Mais da metade (75%) desses pacientes tinham comorbidades ou uma exposição a droga significativa, tais como: artrite reumatóide, diabetes, terapia com glicocorticoide. Em 17 pacientes a exodontia precedeu a OABF, em 3 pacientes havia história de trauma pregresso e em 10 pacientes a OABF ocorreu espontaneamente.

Utreja et al.⁸⁶ realizaram uma revisão de 22 estudos publicados na literatura e observaram que 18 estudos avaliaram a relação entre OABF e extrações dentárias, relatando uma prevalência de osteonecrose que variou de 2,23 a 3,25%. Quatro estudos não evidenciaram relação entre OABF e exodontias. Pichardo e van Merkesteyn⁸⁷ avaliaram 45 casos de OABF e observaram que em 44 (97,5%) pacientes algum possível foco dentário, como exodontias, tratamento dental prévio ou tratamento protético, foi encontrado como fator desencadeante osteonecrose.

Taylor et al.⁸⁸ avaliaram 225 pacientes que faziam uso de BFs orais (202 pacientes) e intravenosos (23 pacientes). Dos 23 pacientes que usavam BF intravenoso, 8 (34,8%) desenvolveram OABF após extração dentária. No grupo de pacientes que usavam BF oral, apenas 5 (2,5%) apresentaram OABF. Os autores concluíram que o risco de desenvolver OABF foi significativamente maior no grupo de pacientes que faziam uso de BFs intravenosos. Watters et al.⁸⁹ avaliaram 109 casos de OABF em pacientes que faziam uso de BFs intravenosos e identificaram uma associação significativa entre a presença de dentes cariados, extraídos ou restaurados, a diabetes e o fumo com a progressão da OABF.

2.5 Lesões periapicais e OABF

A lesão periapical é uma condição inflamatória dos tecidos periradiculares causada por infecção microbiana no canal radicular do dente afetado⁹⁰. Pode ser observada uma inflamação local e reabsorção dos tecidos duros porque esse processo envolve um recrutamento de células inflamatórias, estimulação de citocinas e enzimas líticas e ativação dos osteoclastos^{91,92}. O tratamento é baseado na erradicação das bactérias e prevenção da reinfecção do canal radicular⁷⁹. Após o

tratamento, é esperada uma cicatrização da lesão periapical, com regeneração do tecido duro e redução da radiolucidez⁹⁴.

Algumas vezes o completo reparo do tecido duro não ocorre devido a falhas endodônticas, mas também pode ocorrer por causa de fatores localizados além do sistema de canais radiculares⁹⁵. A dinâmica tecidual do reparo radicular após tratamento endodôntico não cirúrgico e os fatores que podem interferir nesse processo ainda não foram completamente elucidados⁹³.

O tratamento endodôntico é preferível à extração ou cirurgia periapical quando possível⁵³. Em alguns casos, o tratamento não cirúrgico do canal radicular é preferível à extração quando os pacientes usam BFs e o tratamento endodôntico cirúrgico não é recomendado^{7, 96-98}. No entanto, existem alguns relatos na literatura que mostram a OABF ocasionada por procedimentos endodônticos não-cirúrgicos^{96, 97,99}.

Goodell et al.⁹⁹ apresentaram dois casos nos quais o tratamento endodôntico foi o fator desencadeante. Eles relataram que os pacientes tinham uma história de tratamento endodôntico não cirúrgico no dente na área afetada pela OABF e afirmaram que o tratamento foi realizado após início da administração de zolendronato. Já Kyrgidis et al.⁹⁸ sugeriram que o tratamento do canal radicular é um procedimento seguro nos pacientes que recebem BFs e pode reduzir a prevalência de OABF.

Katz et al.⁹⁶ relataram 3 casos de OABF e mostraram as implicações endodônticas do manejo desses pacientes. Eles afirmaram que quando o tratamento endodôntico é indicado, devem ser considerados procedimentos que minimizem o trauma aos tecidos marginais, apicais e periodontais. É importante prestar atenção no posicionamento do grampo e lençol de borracha, o comprimento da

instrumentação e obturação durante o tratamento. O tratamento endodôntico não cirúrgico é menos traumático para os tecidos orais e tem sido relatado que pode estar associado à osteonecrose dos maxilares em apenas 0,8% dos casos³⁹. No entanto, o sucesso desse tratamento e o impacto dos BFs na polpa dentária ainda não foram avaliados¹⁰⁰.

Galego et al.¹⁰¹ relataram um caso no qual o tratamento endodôntico foi o fator desencadeante da OABF e discutiram o papel do trauma de mucosa, periodontal e de osso alveolar, causado pelo posicionamento do grampo e lençol de borracha, como um fator de risco para o desenvolvimento de OABF. Eles relataram que um tratamento endodôntico não cirúrgico foi realizado e o molar afetado foi isolado durante o procedimento. Após cinco meses, através de avaliação clínica, eles observaram uma área de ulceração com exposição óssea na área lingual do molar tratado endodonticamente. Eles consideraram que o posicionamento do grampo e lençol de borracha podem causar um trauma do tecido marginal e periodontal e pode ser considerado um fator de risco para desenvolvimento de OABF.

Na lesão periapical, a remodelação óssea é importante no processo de desenvolvimento, progressão e reparo. Sendo assim, a lesão periapical pode potencialmente ser afetada pelo uso de BF. O efeito inibitório dos BF na remodelação óssea pode interferir no processo de reparo periapical que ocorre durante o tratamento endodôntico. Ainda não está bem esclarecido se os BFs têm algum efeito no processo de reparo periapical¹³.

Sarathy et al.⁹⁷ relataram 2 casos de OABF que tiveram como fatores desencadeantes o tratamento endodôntico. Ambos os pacientes estavam usando BFs intravenosos, um tinha um histórico de tratamento endodôntico não cirúrgico e

outro tinha histórico de tratamento endodôntico cirúrgico na área onde a OABF ocorreu. Hsiao et al.¹³ avaliaram o processo de reparo de lesões periapicais em pacientes que faziam uso de BFs orais e eles observaram que a taxa de reparo desses pacientes não foi significativamente diferente que a taxa dos pacientes controles. Eles concluíram que o paciente que usa BF oral tem uma cicatrização periapical satisfatória após o tratamento endodôntico e eles afirmaram que esse tratamento é uma boa opção para pacientes que fazem uso de BFs. No entanto, deve ser considerado que os autores analisaram apenas BFs orais e que seria interessante avaliar também pacientes que fazem uso de BFs intravenosos, uma vez que eles têm efeitos colaterais mais severos. Além disso, eles analisaram poucos casos o que pode explicar porque os autores não encontraram resultados significantes.

Devido a sua alta afinidade a estruturas mineralizadas como osso e dentina, é possível que os BFs fiquem acumulados na dentina e, como resultado, as células da polpa podem ser expostas a droga. Estudos na literatura não mostram claramente esse efeito do BFs sobre a polpa. Cvikl et al.¹⁰⁰ analisaram o efeito dos BFs intravenosos em células derivadas da polpa dentária e mostraram que essas drogas podem reduzir a viabilidade e atividade celular, levando a apoptose e necrose.

Xiong et al.¹⁴ fizeram um estudo experimental com ratos para analisar o efeito do BFs em lesões periapicais, avaliando a reabsorção do osso alveolar e angiogênese. Eles comprovaram que os BFs inibiram significativamente a perda óssea e diminuíram o número de osteoclastos. A matrix de metaloproteinase (MMPs) parece ter um papel do desenvolvimento de lesões periapicais e age na degradação da matriz extracelular. Estudos têm demonstrado que os BFs inibem as MMPs, o que causam uma diminuição dessas MMPs na área periapical, levando a uma inibição da

reabsorção óssea¹⁰². Tjäderhane et al.¹⁰³, por sua vez, observaram que a inibição das MMPs aumentou a taxa de necrose pulpar e formação de lesão.

A baixa incidência de OABF torna difícil a condução de ensaios clínicos que permitam o estabelecimento de diretrizes baseadas em evidências para o tratamento endodôntico não cirúrgico em pacientes que fazem uso de BFs. Apesar da ocorrência de OABF ser considerada rara, suas consequências são catastróficas para o paciente. Por isso, até que mais evidências científicas estejam disponíveis, é preciso ter bastante precaução na realização de um tratamento endodôntico em pacientes que usam BFs¹⁰⁴.

Embora alguns fatores de risco já estejam bem estabelecidos na literatura, outros ainda precisarão ser elucidados, principalmente os fatores de risco orais. Evidências sobre lesões periapicais atuando como um fator de risco ainda é bastante limitado. Existem apenas alguns relatos na literatura mostrando OABF desencadeada por procedimentos endodônticos conservadores^{96,97,99,101}. O efeito inibitório dos bisfosfonatos na remodelação óssea pode interferir potencialmente no processo de reparo da lesão periapical durante o tratamento endodôntico¹³. No entanto, o efeito dos bisfosfonatos no aparecimento e evolução das lesões periapicais ainda não está claramente explicado e, por isso, faz-se necessário o desenvolvimento de mais pesquisas experimentais, laboratoriais e clínica que visem elucidar esse tema.

3. OBJETIVO

Avaliar se a lesão periapical é um fator de risco para o desenvolvimento de osteonecrose associada ao uso de bisfosfonatos.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar através da tomografia computadorizada de feixe-cônico e análise histológica, lesões periapicais crônicas e osso adjacente em ratos tratados com zolendronato;
- Determinar tamanho das lesões periapicais, intensidade da reação inflamatória e presença de necrose óssea.



***Effects of the zolendronate in periapical
lesions and surrounding alveolar
bone in a murine model.***

4. EFFECTS OF THE ZOLENDRONATE IN PERIAPICAL LESIONS AND SURROUNDING ALVEOLAR BONE IN A MURINE MODEL.

The study are presented in a form of an original article and had the objective to determine if periapical lesions are risk factors to the development of osteonecrosis in Wistars rats treated with zolendronate.

4.1 Introduction

Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) is characterized by an avascular necrosis of the mandible or maxilla in patients taking BPs and not exposed to radiotherapy in the head and neck region (1,2). Studies have shown some risk factors that are significant to the development of this condition, such as type of bisphosphonates, route of administration (oral or endovenous), number of infusions, age and dental extractions (3-9). BRONJ usually occurs after a dental invasive procedure but it can also happen spontaneously (10).

Although some risk factors are well established in the literature, others remain unclear, mainly oral risk factors. Evidence about periapical lesions acting as a risk factor is limited. There are only some reports in the literature showing BRONJ triggered by conservative endodontic procedures (11-14). Animal models have been also used to evaluate whether the periapical lesions can be considered a risk factor for development of OABF. Xiong et al. (15) evaluated the effects of administration of alendronate in the alveolar bone resorption processes in rats with periapical lesions. They observed that administration of bisphosphonates inhibit bone resorption associated with apical periodontitis, however, they did not diagnose ulcers or

osteonecrosis. Kang et al. (16) evaluated the effect of zoledronate in periapical lesions in rats and they identified OABF cases in these animals.

The inhibitory effect of bisphosphonates on bone remodeling can also potentially interfere with periradicular healing during root canal therapy. However, the effect of bisphosphonates on the onset and evolution of periapical lesions is not clearly explained (17). Thus, the aim of this study was to determine if periapical lesions are risk factors to the development of osteonecrosis in animals treated with zoledronate and to analyze chronic periapical lesions and the surrounding adjacent bone in rats treated with zoledronate, using histological analyses and cone- beam computed tomography.

4.2 Methods

The Ethics Committee of Animal Use of the Biological Science Center of Federal University of Pernambuco (UFPE) approved this study with protocol number 23076.027486/2010-25. Forty males rats (*Rattus norvegicus, albinus* Wistar) were used, weighing between 220 and 250 grams, which were randomly divided into 8 groups, being 4 experimental groups and 4 control groups.

The animals of experimental group were treated with zoledronate (Zometa Novartis Pharmaceuticals, Basel, Switzerland) using a dosage of 0.15 mg/kg/week, administered intraperitoneally, while control groups were treated with saline solution (NaCl 0.9%) also administered intraperitoneally. The experimental and control groups were composed for: G1- induction of periapical lesion (PL) and administration of NaCl 0.9% for 4 weeks; G2- induction of PL and administration of zoledronate for 4 weeks; G3- induction of PL and administration of NaCl 0.9% for 8 weeks; G4-

induction of PL and administration of zoledronate for 8 weeks; G5- administration of NaCl 0.9% for 4 weeks and subsequent induction of PL; G6- administration of zoledronate for 4 weeks and subsequent induction of PL; G7- administration of NaCl 0.9% for 8 weeks and subsequent induction of PL; G8- administration of zoledronate for 8 weeks and subsequent induction of PL (Table 1).

In order to induce periapical lesions in the animals, the pulps of the right first mandibular molars were exposed on the occlusal mesial face using a ½ round bur on a high-speed hand piece, under water coolant (Fig. 1). The dental pulps remained exposed for 30 days in the oral cavity. Prior to the pulp exposition, the animals were anesthetized with ketamine hydrochloride 0.1 mg/kg (SESP, Vetbrands Animal Health Division, Jacarei, São Paulo, Brazil) associated with xylazine 0.05 mg/ kg (Bayer Brazil, Beford Roxo, Rio de Janeiro, Brazil), intramuscularly.

After the period of analysis established, the animals were euthanized by anesthetic overdose with ketamine hydrochloride. The mandible was dissected and placed into plastic recipient containing 10% formaldehyde solution. In these recipients, the specimens were submitted to cone- beam computed tomography (CBCT) (i-CAT Next Generation, Imaging Sciences International, Hatfield, PA), operating at 120 kV and 3.8 mA, using a protocol with voxel size of 0.2 mm and an exposure time of 26 seconds. Then, images were reconstructed and evaluated using the XORAN software (Xoran CAT versão 2.0.21, Xoran Technologies, Ann Arbor Mich, EUA). A specialist in Oral Radiology with experience in the method used analyzed the images in multiplanar reconstructions (axial, sagittal and coronal). The measurement was taking in the larger diameter of the lesions in each specimen analyzed (Fig. 2). It was used a 22"flat screen monitor (Dell Precision 390™, Dell

Inc., Round Rock, Texas, EUA). Images density and contrast were accordingly adjusted to help the observer.

After the image analyses, the jaws were decalcified in 5.0% aqueous solution of ethylenediaminetetracetic acid (EDTA). Then, a histological conventional analysis was performed and the specimens were embedded in paraffin. Histological sections of 5 μm thick were obtained from paraffin blocks and stained with hematoxylin-eosin (HE). In order to determine the intensity of the inflammatory infiltrates and the presence of bone necrosis, a histological analysis was carried out. The inflammatory reaction in the periapical lesions was classified as slight (scarce or focal inflammatory reaction), moderate (moderate amount of inflammatory cells) or severe (diffuse inflammatory reaction).

The histological and imaginological data were analyzed by descriptive statistic. The imaginological data that showed uniform distribution were analyzed by ANOVA and those that showed non-homogeneous distribution, the nonparametric Kruskal-Wallis test was used, considering a significance of 5%. Statistical calculations were performed using SAS 9.2 software.

4.3 Results

In control and zolendronate groups, ulcers or osteonecrosis with exposure of bone were not observed when the mandible were removed and examined. Periapical lesions were evident in the periapical area after pulpal exposure in all animals studied. These lesions were identified by CBCT and histomorphological analysis.

Imaginological analysis by CBCT revealed periapical lesions associated with the right mandibular first molars in all animals. Comparing the control and

experimental groups submitted to the same procedures and conditions, it can be seen that the groups treated with zoledronate (G2, G4, G6 and G8) show the size of periapical lesions significantly smaller than the groups treated with NaCl 0.9% (G1, G3 G5 and G7), respectively ($p < 0.0001$) (Fig. 3).

Table 1 shows the mean size in millimeters of periapical lesions in control and treated animals. Analyzing the matching control and experimental groups, the comparison revealed that the control groups G1, G3 and G7 presented periapical lesions significantly larger than the experimental groups G2 ($p=0.0009$), G4 ($p=0.0015$) and G8 ($p=0.0078$), respectively. However, although the specimens of G5 presented periapical lesions larger than G6, this difference was not significant ($p=0.0736$).

Table 1 shows the mean size of the periapical lesions according to the groups, in addition to the matching analysis. Comparing the control groups with each other (G1, G3, G5 and G7), it was observed that the size of periapical lesions were statistically different ($p = 0.0026$). The groups G1 and G3, in which the periapical lesions were induced and subsequently started applications of saline solution, showed larger periapical lesions (Table 1). Comparing animals treated with zoledronate (G2, G4, G6 and G8), it was also observed that the size of periapical lesions were statistically different ($p < 0.0001$). The groups G2 and G4, in which the periapical lesions were induced and then the administration of zoledronate started, showed larger periapical lesions (Table 1).

Microscopically, in all specimens, the chronic periapical lesions were well circumscribed and consisted in chronic inflammatory reaction ranging from mild to moderate intensity, formed predominantly for lymphocytes. No morphological

differences were observed between the analyzed groups (Fig. 4). Additionally, in all samples, no necrosis was observed in the adjacent bone tissue.

4.4 Discussion

The mechanism of development of BRONJ has not yet been fully elucidated, but the presence of periodontal disease and dental extractions are among the local risk factors most commonly related (10,18). Although some local risk factors were well established in the literature, others remain unclear. Evidence about periapical lesions acting as a risk factor is limited. There are some reports in the literature showing BRONJ caused by conservative endodontic procedures (11-14). However, the effect of the periapical lesions on the bone tissue under BPs is not clearly explained. Elucidating BRONJ pathophysiology is very important to the establishment of protocols of endodontic treatment in patients using BFs. Therefore, until more scientific evidence is available, it is necessary precaution in performing endodontic treatment in these patients (19).

In order to generate evidence that can help in the creation of these protocols, this study observed the behavior of periapical lesions in rats treated with BPs. Other studies have also used animal models to simulate what occurs in patients using BPs (20-28). The majority of these researches used tooth extractions and high doses of BPs to simulate clinical, radiographic and histologic features of BRONJ (16). Because BRONJ may occur in the absence of tooth extractions, it is relevant using animal models to simulate others conditions also important in dental practices and that eventually may also act as risk factor for BRONJ, as the inflammatory periapical lesions.

The periapical lesions were induced by pulp exposure according to protocols used in the literature (15). Studies have showed that after pulp exposure in rats, osteoclasts in periapical lesions could be found at day 2 and the peak number of these cells was reached at day 14. In these studies, it was also observed that increasing amounts of inflammatory infiltration and alveolar bone resorption occurred in the periapical region from day 7 to day 14 (29,30). Between day 0 and day 20 occurred a period of lesion expansion and bone destruction (31). Based on these studies, the pulps were exposed in the oral cavity for a period of 30 days to induce periapical lesion.

Although zoledronate be administered intravenously, in the present study it was administered intraperitoneally, similar to other published reports (16,32). Even knowing that intraperitoneal administration results in a lower plasmatic concentration of the drug, it was chosen because it is more secure and easy to use in small animals. The doses used in experimental studies vary widely. Ottewill et al. (32) administered a dose of 0.1 mg/kg (100µg/kg), which according to these authors, is equivalent to a human dose of 4 mg/ kg of body weight. Sonis et al. (20) used a dose of 7.5 µg/kg, whereas Pautke et al. (28) used the dose of 0.05 mg/kg of zoledronate in minipigs. In this study, we used the dose of 0.15 mg/ kg/ week based on the dose of 0.6 mg/kg/28 days used by Maahs et al. (33). Although it can be considered a high dose, its use has been safety demonstrated in these previous studies and it was chosen to increase the probability of BRONJ in the studied animals.

Studies have been observed that inhibition of osteoclast activity resulted in smaller periapical lesions (16, 34, 35). Similar to occurred in previous experiments, the current study observed that the periapical lesions in animals treated with zoledronate showed the lesions significantly smaller than that located in animals

from the control group. Kang et al. (16) assessed the apices of the molar roots of mouse mandibles by micro-computed tomography scanning. They also observed that the size of periapical lesions was significantly smaller in the animals treated with BPs. Bone remodeling is an important process in the development, progression and repair of periapical lesions. Once the BPs act by inhibiting bone resorption, its inhibitory effect may interfere in periapical repair process that occurs during endodontic treatment (17). In the present study, it was proved that in animals treated with BP, periapical lesions tend to have smaller sizes than in animals that do not use BP. Clinically this suggests that patients using BP can have a satisfactory periapical healing after endodontic treatment, once the BPs did not increase the size of the lesion (16,17,34,35).

In the control and experimental groups in which the periapical lesions were induced and subsequently started applications of saline solution or zoledronate, it was observed larger periapical lesions. However, whether the lesion is already present or not when the drug administration started, it did not influence their evolution, cell population and also the risk of BRONJ. Probably, lesions of G1, G2, G3 and G4 had larger sizes because the tooth remained in the oral cavity of the animal for a longer period of time than in the other groups, allowing further growth of the lesions. Clinically, this suggests that the appearance of the periapical lesion before or during treatment with bisphosphonates does not interfere in the development of these lesions and does not increase the risk of BRONJ.

Regarding the histological features, the periapical lesions showed mild to moderate chronic inflammatory reaction, without morphological differences between the all groups. Importantly, even using high doses of zoledronate, osteonecrosis was not observed in all specimens. Xiong et al. (15) conducted a study to analyze the

effect of alendronate on angiogenesis and on alveolar bone resorption in rats subjected to experimental periapical lesions. They did not observe a significant decrease in the number of microvascular vessels and, similar to the present study, no ulcers or BRONJ were observed. On the other hand, Kang et al (16) observed that 88% of BP treated animals showed areas of osteonecrosis in the dental disease site and 33% developed bone exposure. Moreover, osteonecrosis, periosteal thickening, periosteal bone apposition, epithelial migration and bone exposure were present. However, this high incidence of BRONJ observed probably occurred because the authors used a threefold higher dose than the oncologic zolendronate dose used clinically in patients. Differently, in the present study it was used a pharmacologic doses similar to clinical regimens, wich provide a more accurate evaluation of incidence and severity of the disease.

In the literature, some studies have reported endodontic treatment as a risk factor for BRONJ (11,13). By contrast, other studies claim that endodontic treatment is safe and should be performed in preference to extraction (36, 12,37, 38). However, even if the endodontic treatment is indicated, dentists need to take some precautions. It should be considered procedures that minimize the trauma to the marginal, apical and periodontal tissues. It is important to pay attention to the periapical radiographs, the position of the clamp and rubber dam, the length of instrumentation and obturation during treatment (11).

According to the present findings, periapical lesions apparently do not represent a risk factor for the development of BRONJ, once no ulcers or osteonecrosis of the bone were observed in the jaws of animals treated with zolendronate. Even so, further scientific evidence is necessary in order to provide secure protocols for dental care of patients who use bisphosphonates.

4.5 Conclusion

Periapical lesions were significantly smaller in animals treated with zoledronate. Zoledronate did not alter the cell population of the periapical lesion. Furthermore, the presence of periapical lesion is apparently not an important risk factor to the development of BRONJ.

4.6 Acknowledgments

The authors are thankful to The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the financial support of this work.

4.7 References

1. Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62:527–34.
2. Marx. Pamidronate (Aredia) and Zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61:1115-18.
3. Bamias A, Kastiritis E, Bamia C, et al. Osteonecrosis of the Jaw in Cancer After Treatment With Bisphosphonates: Incidence and Risk Factors. *J Clin Oncol* 2005; 23:8580-87.
4. Estilo CL, Van Poznak CH, Williams T, et al. Osteonecrosis of the Maxilla and Mandible in Patients with Advanced Cancer Treated with Bisphosphonate Therapy. *The Oncologist* 2008;13:911-20.
5. Hoff AO, Toth BB, Altunday K, et al. Osteonecrosis of the jaw in patients receiving intravenous bisphosphonate therapy. *J Clin Oncol* 2006;24:8528.
6. Vescovi P, Campisi G, Fusco V, et al. Surgery-triggered and non surgery-triggered Bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Jaws (BRONJ): A retrospective analysis of 567 cases in an Italian multicenter study. *Oral Oncol* 2011;47: 191–94.
7. Otto S, Schreyer C, Hafner S, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws e Characteristics, risk factors, clinical features, localization and impact on oncological treatment. *J Craniomaxillofac Surg* 2012;40(4):303-9.
8. Taylor T, Bryant C, Popat S. A study of 225 patients on bisphosphonates presenting to the bisphosphonate clinic at King's College Hospital. *Br Dent J* 2013;214(7):18.
9. Watters AL, Hansen HJ, Williams T, et al. Intravenous bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: long-term follow-up of 109 patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013;115(2):192-200.

10. Migliorati CA, Schubert MM, Peterson DE, et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of mandibular and maxillary bone: an emerging oral complication of supportive cancer therapy. *Cancer* 2005;104: 83–93.
11. Katz H. Endodontic Implications of Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaws: A Report of Three Cases. *J Endod* 2005;31(11):831-34.
12. Sarathy AP, Bourgeois SL, Goodell GG. Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaws and Endodontic Treatment: Two Case Reports. *J Endod* 2005;31(10):759-63.
13. Goodell G. Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaws and Endodontic Treatment: Two Case Reports. *J Mass Dent Soc* 2006;55(1):44-8.
14. Gallego L, Junquera L, Pelaz A, et al. Rubber Dam Clamp Trauma During Endodontic Treatment: A Risk Factor of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw? *J Oral Maxillofac Surg* 2011;69:93-5.
15. Xiong H, Wei L, Hu Y, et al. Effect of alendronate on alveolar bone resorption and angiogenesis in rats with experimental periapical lesions. *Int Endod J* 2010;43:485–491.
16. Kang B, Cheong S, Chaichanasakul T, et al. Periapical disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in mice. *J Bone Miner Res* 2013; 28(7):1631–40.
17. Hsiao A, Glickman G, He J. A Retrospective Clinical and Radiographic Study on Healing of Periradicular Lesions in Patients Taking Oral Bisphosphonates. *J Endod* 2009;35(11):1525-28.
18. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws—2009 update. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67: 2–12.
19. Moizadeh AT, Shemesh H, Neirynck NAM, Aubert C, Wesselink PR. Bisphosphonates and their clinical implications in endodontic therapy. *Int Endod J* 2013;46:391–98.

20. Sonis ST, Watkins BA, Lyng GD, et al. Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. *Oral Oncol* 2009; 45(2):164-72.

21. Bi Y, Gao Y, Ehrichtou D, Cao C et al. Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *Am J Pathol* 2010;177:280–90.

22. Lopez-Jornet P, Camacho-Alonso F, Molina-Minano F, et al. An experimental study of bisphosphonate-induced jaws osteonecrosis in Sprague-Dawley rats. *J Oral Pathol Med* 2010;39:697–702.

23. Kikuri T, Kim I, Yamaza T, et al. Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *J Bone Miner Res* 2010;25:1668–79.

24. Aghaloo TL, Kang B, Sung EC, et al. Periodontal disease and Bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. *J Bone Miner Res* 2011;26:1871–82.

25. Ali-Erdem M, Burak-Cankaya A, Cemil-Isler S et al. Extraction socket healing in rats treated with bisphosphonate: animal model for bisphosphonate related osteonecrosis of jaws in multiple myeloma patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011;16:879–3.

26. Abtahi J, Agholme F, Sandberg O, et al. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw in a rat model arises first after the bone has become exposed. No primary necrosis in unexposed bone. *J Oral Pathol Med* 2012;41:494–9.

27. Aguirre JI, Akhter MP, Kimmel DB, et al. Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in rice rats (*Oryzomys palustris*) with periodontitis. *J Bone Miner Res* 2012;27:2130–43.

28. Pautke C, Kreutzer K, Weitz J, et al. Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw: a minipig large animal model. *Bone* 2012;51:592–9.

29. Zhang X, Peng B. Immunolocalization of receptor activator of NF kappa B ligand in rat periapical lesions. *J Endod* 2005;31(8):574-7.
30. Yang L, Zhang C, Peng B. Immunolocalization of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 in rat periapical lesions. *J Endod* 2009;35(6):834-7.
31. Lin SK, Hong CY, Chang HH, et al. Immunolocalization of macrophages and transforming growth factor- β 1 in induced rat periapical lesions. *J Endod* 2000;26:335–40.
32. Ottewell PD, Monkkönen H, Jones M, et al. Antitumor effects of doxorubicin followed by zoledronic acid in a mouse model of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2008;100(16):1167–78.
33. Maahs MP, Azambuja AA, Campos MM, et al. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats. *Head Neck* 2011;33(2):199-207.
34. Xiong H, Peng B, Zhang X, et al. Effect of an Estrogen-deficient State and Alendronate Therapy on Bone Loss Resulting from Experimental Periapical Lesions in Rats. *J Endod* 2007;33:1304–08.
35. Gao B, Chen W, Hao L et al. Inhibiting periapical lesions through AAV-RNAi silencing of cathepsin K. *J Dent Res* 2013;92(2):180–6.
36. Ruggiero SL, Fantasia J, Carlson E. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:433–41.
37. Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, et al. Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw: Report of a Task Force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Min Res* 2007;22(10):1479-91.

38. Kyrgidis A, Vahtsevanos K, Koloutsos G, Andreadis C, Boukovinas I, Teleioudis z, et al. Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws: A Case-Control Study of Risk Factors in Breast Cancer Patients. *J Clin Oncol* 2008;26(28):4634-38.

4.8 Table

Table 1 - Mean size of the periapical lesions and analysis of matching control and experimental groups

Groups	Procedures	Mean size in mm (minimum-maximum)	<i>p</i> value*
G1	Induction of PL and administration of NaCL 0.9% for 4 weeks	1.72 (1.6-2.0)	0.0009
G2	Induction of PL and administration of zolendronate for 4 weeks	1.2 (1.0-1.4)	
G3	Induction of PL and administration of NaCl 0.9% for 8 weeks	1.64 (1.5-1.8)	0.0015
G4	Induction of PL and administration of zolendronate for 8 weeks	1.2 (1.0-1.4)	
G5	Administration of NaCl 0.9% for 4 weeks and induction of PL	1.04 (0.8-1.2)	0.0736
G6	Administration of zolendronate for 4 weeks and induction of PL	0.8 (0.6-1.0)	
G7	Administration of NaCl 0.9% for 8 weeks and induction of PL	1.44 (1.4-1.6)	0.0078
G8	Administration of zolendronate for 8 weeks and induction of PL	0.64 (0.4-0.8)	

**p* value resulting from the comparison between groups G1xG2, G3xG4, G5xG6 and G7xG8.

4.9 Figures

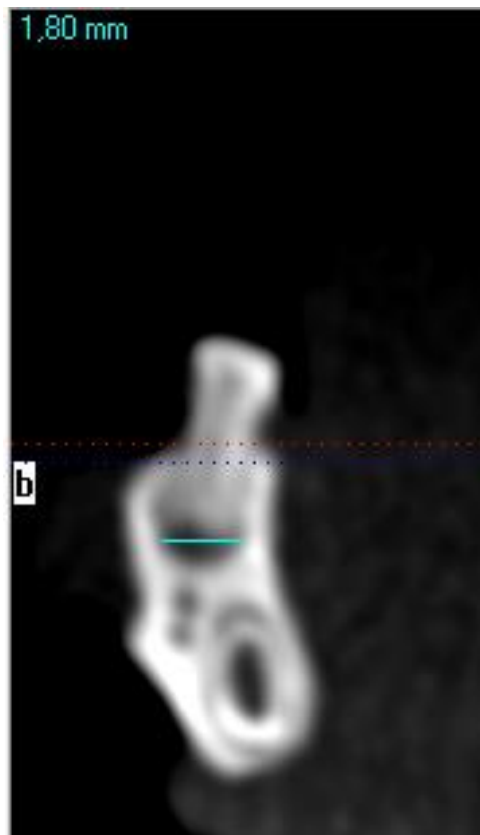


Figure 1: Coronal section with 0.2mm thick showing the measurement of the periapical lesion in a specimen of G3.

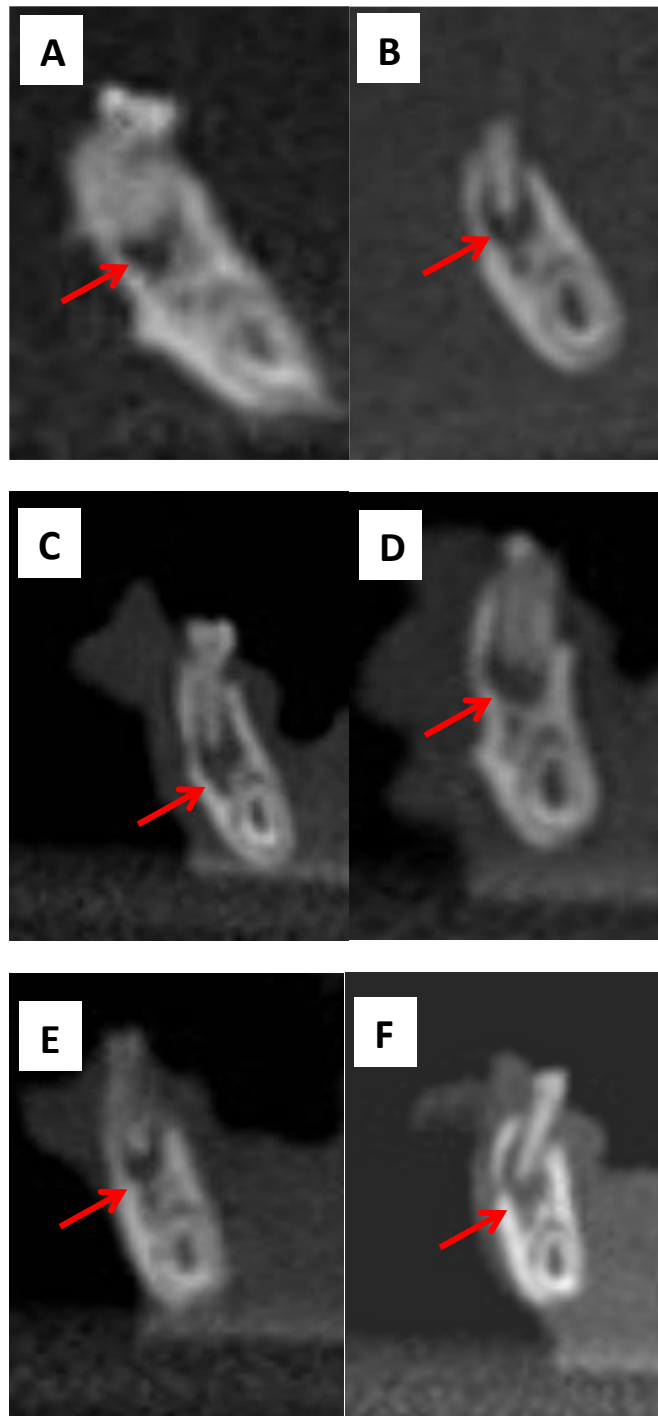


Figure 2: Coronal reconstruction with 0.2 mm thick. Red arrows indicate periapical lesion in G1 (A), G2 (B), G4 (C), G5 (D), G6 (E) and G8 (F).

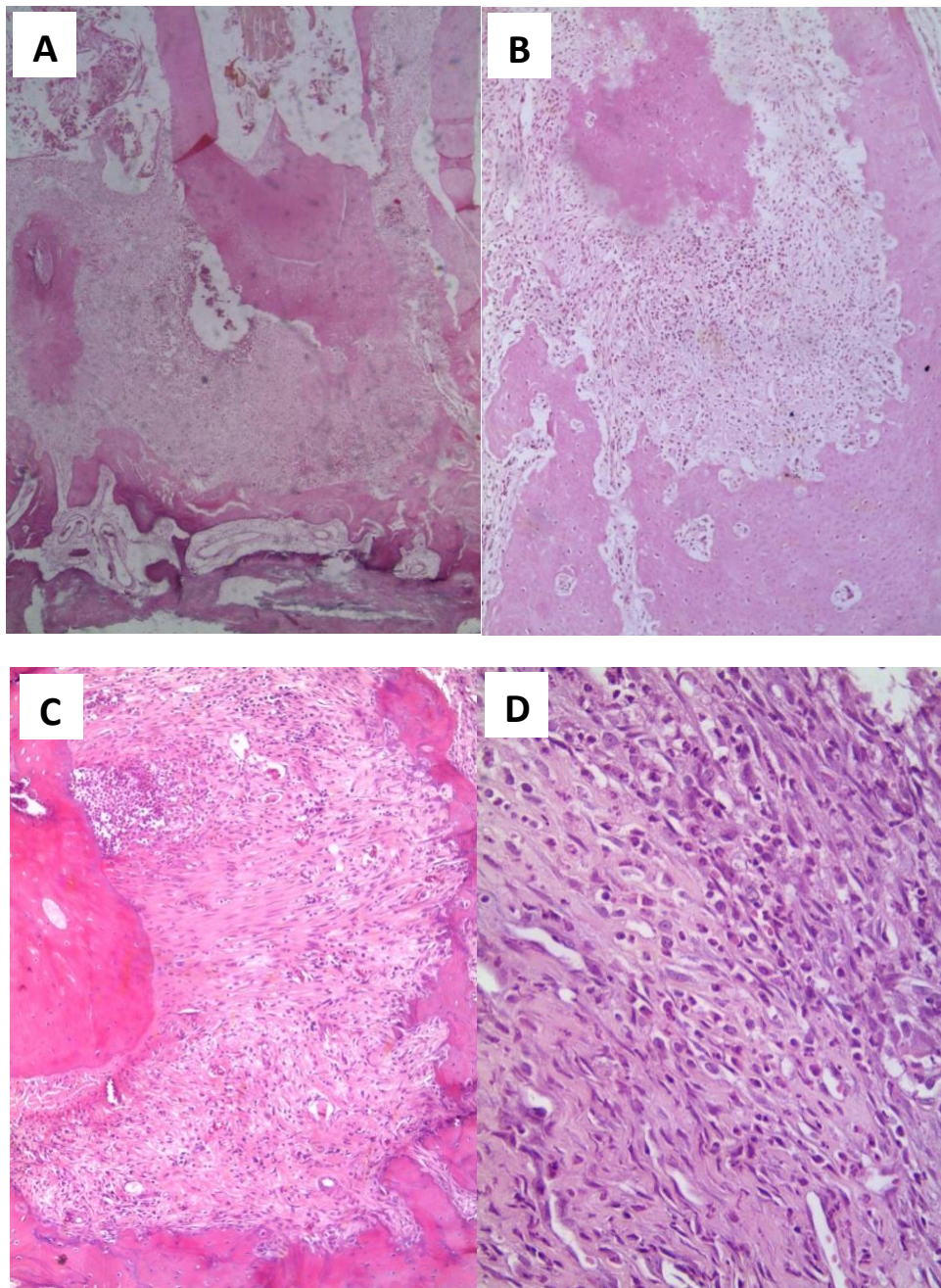


Figure 3: Histological findings in periapical region. (A) Group 1 (B) Group 2 and (C) Group 3 showing slight inflammatory infiltrate (hematoxylin and eosin, original magnification, x40 and x100). (D) Specimen from Group 7 shows a moderate inflammatory infiltration (hematoxylin and eosin, original magnification, x200).

5. CONCLUSÃO

As lesões periapicais foram significativamente menores nos animais tratados com zolendronato. A presença de lesão periapical não é um importante fator de risco para o desenvolvimento de OABF. Além disso, o zolendronato não alterou o padrão histomorfológico da lesão periapical.

REFERÊNCIAS

1. Rogers MJ. New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Curr Pharm Des* 2003;9:2643–58.
2. Stresing V, Daubine F, Benzaid I, Mönkkönen H, Clezardin P. Bisphosphonates in cancer therapy. *Cancer Letters* 2007;257:16–35.
3. Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Mönkkönen J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone* 2011;49(1):34-41.
4. Lacerna L, Hohneker J. Zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with breast cancer and other solid tumors. *Semin Oncol* 2003; 30:150–60.
5. Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62:527–34.
6. Bamias A, Kastritis E, Bamia C, Moulopoulos LA, Melakopoulos I, Bozas G, et al. Osteonecrosis of the Jaw in Cancer After Treatment With Bisphosphonates: Incidence and Risk Factors. *J Clin Oncol* 2005; 23:8580-87.
7. Ruggiero SL, Fantasia J, Carlson E. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:433–41.
8. Sarin J, De Rossi SS, Akintoye SO. Updates on bisphosphonates and potential pathobiology of bisphosphonate-induced jaw osteonecrosis. *Oral Diseases* 2008;14: 277–85.
9. Marx. Pamidronate (Aredia) and Zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61:1115-18.

10. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS). American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65(3):369-76.

11. Estilo CL, Van Poznak CH, Williams T, Bohle GC, Lwin PT, Zhou Q, et al. Osteonecrosis of the Maxilla and Mandible in Patients with Advanced Cancer Treated with Bisphosphonate Therapy. *The Oncologist* 2008;13:911–20.

12. Hoff AO, Toth BB, Altunday K, Guarneri V, Adamus A, Nooka AK, et al. Osteonecrosis of the jaw in patients receiving intravenous bisphosphonate therapy. *J Clin Oncol* 2006;24:8528.

13. Hsiao A, Glickman G, He J. A Retrospective Clinical and Radiographic Study on Healing of Periradicular Lesions in Patients Taking Oral Bisphosphonates. *J Endod* 2009;35(11):1525-28.

14. Xiong H, Wei L, Hu Y, et al. Effect of alendronate on alveolar bone resorption and angiogenesis in rats with experimental periapical lesions. *Int Endod J* 2010;43:485–491.

15. Kang B, Cheong S, Chaichanasakul T, et al. Periapical disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in mice. *J Bone Miner Res* 2013;28(7):1631–40.

16. Licata AA. Bisphosphonate therapy. *Am J Med Sci* 1997;313(1):17-22.

17. Lin JH. Bisphosphonates: A Review of Their Pharmacokinetic Properties. *Bone* 1996; 18:75-85.

18. Reszka AA. Mecanismos de acción e los bisfofonatos In: Moral JAR, Macías JG. *Manual Práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral*. Madrid: Jarpyo; 2004. p. 175-181.

19. Fleisch H. Bisphosphonates: a new class of drugs in diseases of bone and calcium metabolism. *Recent Results Cancer Res* 1989;116:1-28.

20. Cheng A, Mavrokokki A, Carter G, Stein B, Fazzalari NL, Wilson DF, et al. The dental implications of bisphosphonates and bone disease. *Aust Dent J* 2005;50(4):4-13.
21. Woo SB, Hellstein JW, Kalmar JR. Narrative review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med* 2006;144:753–61.
22. Rodan GA, Fleisch HA. Bisphosphonates: Mechanisms of Action. *J Clin Invest* 1996;97(12):2692–96.
23. Hughes DE, Wright KR, Uy HL, Sasaki A, Yoneda T, Roodman GD, et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 1995;10:1478.
24. Viereck V, Emons G, Lauck V, Frosch KH, Blaschke S, Gründker C, et al. Bisphosphonates Pamidronate and Zoledronic Acid Stimulate Osteoprotegerin Production by Primary Human Osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291(3):680–86.
25. Kostenuik PJ. Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength. *Curr Opin Pharmacol* 2005;5:618–25.
26. Morete J, Planas J. Pérdida de masa ósea en pacientes con cáncer de próstata sometidos a privación androgénica. *Actas Urol Esp* 2011;35(4):232-239.
27. Suzuki K, Takeyama S, Sakai Y, Yamada S, Shinoda H. Current topics in pharmacological research on bone metabolism: inhibitory effects of bisphosphonates on the differentiation and activity of osteoclasts. *J Pharm Scie* 2006;100(3):189-94.
28. Clezardin P, Massaia M. Nitrogen-containing bisphosphonates and cancer immunotherapy. *Cur Pharm Des* 2010; 27(8): 3007-14.
29. Delmas PD. The use of bisphosphonates in the treatment of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:462.

30. Letocha AD, Cintas HL, Troendle JF, Reynolds JC, Cann CE, Chernoff EJ, et al. Controlled trial of pamidronate in children with types III and IV osteogenesis imperfecta confirms vertebral gains but not short-term functional improvement. *J Bone Miner Res* 2005; 20:977.
31. Kumar V, Sinha R. Evolution and etiopathogenesis of bisphosphonates induced osteonecrosis of the jaw. *N Am J Med Sci* 2013; 5(4):260-5.
32. Bhutani G, Gupta MC. Emerging therapies for the treatment of osteoporosis. *J Midlife Health* 2013; 4(3):147-152.
33. Eriksen EF, Díez-Pérez A, Boonen S. Update on long-term treatment with bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis: a systematic review. *Bone* 2014;58:126-35.
34. Ibrahim T, Farolfi A, Mercatali L, Ricci M, Amadori D. Metastatic bone disease in the era of bone-targeted therapy: clinical impact. *Tumori* 2013;99(1):1-9.
35. Tolia M, Zygogianni A, Kouvaris JR, Meristoudis C, Margari N, Karakitsos P et al. The key role of bisphosphonates in the supportive care of cancer patients. *Anticancer Res* 2014;34(1):23-37.
36. Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcene A, Devy L, Foidart JM, et al. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302:1055–61.
37. Green JR. Bisphosphonates: preclinical review. *Oncologist* 2004;9:3–13.
38. Vincenzi B, Santini D, Dicuonzo G, Battistoni F, Gavasci M, La Cesa A, et al. Zoledronic acid-related angiogenesis modifications and survival in advanced breast cancer patients. *J Interferon Cytokine Res* 2005;25:144–51.
39. Marx RE, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-Induced Exposed Bone (Osteonecrosis/Osteopetrosis) of the Jaws: Risk Factors, Recognition, Prevention, and Treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63:1567–75.

40. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws–2009 update. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67: 2–12.

41. Arce K, Assael LA, Weissman JL, Markiewicz MR. Imaging Findings in Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of Jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67(1):75-84.

42. Estilo CL, Van Posnak CH, Williams T, et al. Osteonecrosis of the maxilla and mandible in patients treated with bisphosphonates: a retrospective study. *J Clin Oncol. Proc Am Soc Clin Oncol* 2004; 22:8088.

43. Chiandussi S, Biasotto M, Dore F, Cavalli F, Cova MA, Lenarda RD. Clinical and diagnostic imaging of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Dentomaxillofac Radiol* 2006;35,236–43.

44. Hutchinson M, O’Ryan F, Chavez V, Lathon PV, Sanchez G, Hatcher DC et al. Radiographic Findings in Bisphosphonate Treated Patients With Stage 0 Disease in the Absence of Bone Exposure. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68:2232-40.

45. Olutayo J, Agbaje JO, Jacobs R, Verhaeghe V, Velde FV, Vinckier F. Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw Bone: Radiological Pattern and the Potential Role of CBCT in Early Diagnosis. *J Oral Maxillofac Res* 2010; 1(2):1-9.

46. Wilde F, Heufelder M, Lorenz K, Liese S, Liese J, Helmrich J et al. Prevalence of cone beam computed tomography imaging findings according to the clinical stage of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012;114:804-11.

47. Hansen T, Kunkel M, Weber A, Kirkpatrick JC. Osteonecrosis of the jaws in patients treated with bisphosphonates - histomorphologic analysis in comparison with infected osteoradionecrosis. *J Oral Pathol Med* 2006;35:155–60.

48. Koerdt S, Dax S, Grimaldi H, Ristow O, Kuebler AC, Reuther T. Histomorphologic characteristics of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Oral Pathol Med* 2014; 23:1-6.

49. Sarasquete ME, González M, San Miguel JF, García-Sanz R. Bisphosphonate-related osteonecrosis: genetic and acquired risk factors. *Oral Diseases* 2009; 15: 382-87.
50. Dimopoulos MA, Kastritis E, Anagnostopoulos A, Melakopoulos I, Gika D, Moulopoulos LA, et al: Osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma treated with bisphosphonates: evidence of increased risk after treatment with zoledronic acid. *Haematologica* 2006; 91: 968-71.
51. Durie BGM, Katz M, Crowley J. Osteonecrosis of the jaws and bisphosphonates. *N Engl J Med* 2005;7:353:99.
52. Badros A, Weikel D, Salama A, Goloubeva O, Schneider A, Rapoport A, et al. Osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma patients: clinical features and risk factors. *J Clin Oncol* 2006;24:945.
53. Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, et al. Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw: Report of a Task Force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Min Res* 2007; 22(10): 1479-91.
54. Dimopoulos MA, Kastritis E, Bamia C, Melakopoulos I, Gika D, Roussou M, et al: Reduction of osteonecrosis of the jaw (ONJ) after implementation of preventive measures in patients with multiple myeloma treated with zoledronic acid. *Ann Oncol* 2009;20:117-20.
55. Yoneda T, Hagino H, Sugimoto T, Ohta H, Takahashi S, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: position paper from the Allied Task Force Committee of Japanese Society for Bone and Mineral Research, Japan Osteoporosis Society, Japanese Society of Periodontology, Japanese Society for Oral and Maxillofacial Radiology, and Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons. *J Bone Miner Metab* 2010;28:365–83.
56. Bagan JV, Murillo J, Jimenez Y, Poveda R, Milian MA, Sanchis JM, et al. Avascular jaw osteonecrosis in association with cancer chemotherapy: series of 10 cases. *J Oral Pathol Med* 2005;34:120–3.

57. Merigo E, Manfredi M, Meleti M, Corradi D, Vescovi P. Jaw bone necrosis without previous dental extractions associated with the use of bisphosphonates (pamidronate and zoledronate): a four-case report. *J Oral Pathol Med* 2005;34(10):613–7.
58. Bagan JV, Jimenez Y, Murillo J, Hernandez S, Poveda R, Sanchis JM, et al. Jaw osteonecrosis associated with bisphosphonates: multiple exposed areas and its relationship to teeth extractions. Study of 20 cases. *Oral Oncol* 2006;42:327–29.
59. Dimitrakopoulos I, Magopoulos C, Karakasis D. Bisphosphonate-induced avascular osteonecrosis of the jaws: a clinical report of 11 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006;35:588–93.
60. Zervas K, Verrou E, Teleioudis Z, Vahtsevanos K, Banti A, Mihou D, et al. Incidence, risk factors and management of osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma: a single-centre experience in 303 patients. *British Journal of Haematology* 2006;134:620–23.
61. Jadu F, Lee L, Pharoah M, Reece D, Wang L. A retrospective study assessing the incidence, risk factors and comorbidities of pamidronate-related necrosis of the jaws in multiple myeloma patients. *Ann Oncol* 2007;18:2015–19.
62. 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;65:2397–410.
63. Walter C, Grötz KA, Kunkel M, Al-Nawas B. Prevalence of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw within the field of osteonecrosis. *Support Care Cancer* 2007;15:197–202.
64. Yarom N, Yahalom R, Shoshani Y, Hamed W, Regev E, Elad S. Osteonecrosis of the jaw induced by orally administered bisphosphonates: incidence, clinical features, predisposing factors and treatment outcome. *Osteoporos Int* 2007;18:1363–70.
65. Boonyapakorn T, Schirmer I, Reichart PA, Sturm I, Masse G. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: Prospective study of 80 patients with multiple myeloma and other malignancies. *Oral Oncol* 2008;44:857– 69.

66. Carmagnola D, Celestino S, Abati S. Dental and periodontal history of oncologic patients on parenteral bisphosphonates with or without osteonecrosis of the jaws: A pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106:10-15.

67. Ibrahim T, Barbanti F, Giorgio-Marrano G, Mercatali L, Ronconi S, Vicini C, Amadori D. Osteonecrosis of the Jaw in Patients with Bone Metastases Treated with Bisphosphonates: A Retrospective Study. *The Oncol* 2008;13:330–36.

68. Kyrgidis A, Vahtsevanos K, Koloutsos G, Andreadis C, Boukovinas I, Teleioudis z, et al. Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws: A Case-Control Study of Risk Factors in Breast Cancer Patients. *J Clin Oncol* 2008;26(28):4634-38.

69. Hoff AO, Toth BB, Altundag K, Johnson MM, Warneke CL, Hu M, et al. Frequency and Risk Factors Associated With Osteonecrosis of the Jaw in Cancer Patients Treated With Intravenous Bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 2008; 23:826–36.

70. Vieillard MH, Maes JM, Penel G, Facon T, Magro L, Bonnetterre J, et al. Thirteen cases of jaw osteonecrosis in patients on bisphosphonate therapy. *Joint Bone Spine* 2008;75:34-40.

71. Assael LA. Oral Bisphosphonates as a Cause of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws: Clinical Findings, Assessment of Risks, and Preventive Strategies *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67:35-43.

72. Junquera L, Gallego L, Cuesta P, Pelaz A, Vicente JC. Clinical experiences with bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws: analysis of 21 cases. *Am J Otolaryngol* 2009; 30:390–95.

73. Saussez S, Javadian R, Hupin C, Magremanne M, Chantrain G, Loeb I, et al. Jaw and its Associated Risk Factors: A Belgian Case Series American association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65:369–76.

74. Vahtsevanos K, Kyrgidis A, Verrou E, Katodritou E, Triaridis S, Andreadis CG, et al. Longitudinal Cohort Study of Risk Factors in Cancer Patients of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw. *Clin Oncol* 2009; 27:5356-62.

75. Walter C, Al-Nawas B, du Bois A, Buch L, Harter P, Grötz KA. Incidence of Bisphosphonate- associated Osteonecrosis of the Jaws in Breast Cancer Patients. *Cancer* 2009;15:1631-37.
76. Chiu CT, Chiang WF, Chuang CY, Chang SW. Resolution of Oral Bisphosphonate and Steroid-Related Osteonecrosis of the Jaw- A Serial Case Analysis. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68:1055-63.
77. Kos M, Brusco D, Kuebler J, Engelke W. Clinical comparison of patients with osteonecrosis of the jaws, with and without a history of bisphosphonates administration. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010;39:1097–102.
78. Hong JW, Nam W, Cha IH, Chung SW, Choi HS, Kim KM, et al. Oral bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: the first report in Asia. *Osteoporos Int* 2010;21:847–53.
79. Williamson RA. Surgical management of bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010;39:251–55.
80. Stockmann P, Vairaktaris E, Wehrhan F, Seiss M, Schwarz S, Spriewald B, et al. Osteotomy and primary wound closure in bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw: a prospective clinical study with 12 months follow-up. *Support Care Cancer* 2010;18:449–60.
81. Vescovi P, Campisi G, Fusco V, Mergoni G, Manfredi M, Merigo E, et al. Surgery-triggered and non surgery-triggered Bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Jaws (BRONJ): A retrospective analysis of 567 cases in an Italian multicenter study. *Oral Oncol* 2011;47: 191–94.
82. Manfredi M, Merigo E, Guidotti R, Meleti M, Vescovi P. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a case series of 25 patients affected by osteoporosis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2011; 40: 277–84.
83. Maurer P, Sandulescu T, Kriwalsky MS, Rashad A, Hollstein S, Stricker I, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the maxilla and sinusitis maxillaris. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2011; 40: 285–91.

84. Otto S, Schreyer C, Hafner S, Mast G, Ehrenfeld M, Stürzenbaum S, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws e Characteristics, risk factors, clinical features, localization and impact on oncological treatment. *J Craniomaxillofac Surg* 2012;40(4):303-9.
85. O’Ryan FS, Lo JC. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in patients with oral bisphosphonate exposure: clinical course and outcomes. *J Oral Maxillofac Surg* 2012; 70(8):1844-53.
86. Utreja A, Almas K, Javed F. Dental extraction as a risk factor for bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw in cancer patients: an update. *Odontostomatol Trop* 2013;36(142):38-46.
87. Pichardo SE, van Merkesteyn JP. Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws: spontaneous or dental origin? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013;116(3):287-92.
88. Taylor T, Bryant C, Popat S. A study of 225 patients on bisphosphonates presenting to the bisphosphonate clinic at King's College Hospital. *Br Dent J* 2013;214(7):E18.
89. Watters AL, Hansen HJ, Williams T, Chou JF, Riedel E, Halpern J, et al. Intravenous bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: long-term follow-up of 109 patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013;115(2):192-200.
90. Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. Umea, Sweden. Thesis [Dr. Odont Thesis]- University of Umea; 1976.
91. Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15(6):348-81.
92. Zhang X, Peng B. Immunolocalization of receptor activator of NF kappa B ligand in rat periapical lesions. *J Endod* 2005;31(8):574-7.
93. Nair PNR. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J* 2006;39:249–81.

94. Sundqvist G, Figdor D. Endodontic treatment of apical periodontitis. In: Orstavik D, Pitt Ford TR. *Essential Endodontology*. Oxford, UK: Blackwell; 1998. p. 242–77.
95. Nair PNR. Non-microbial etiology: foreign body reaction maintaining post-treatment apical periodontitis. *Endod Topics* 2003;6:96–113.
96. Katz H. Endodontic Implications of Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaws: A Report of Three Cases. *J Endod* 2005;31(11):831-34.
97. Sarathy AP, Bourgeois SL, Goodell GG. Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaws and Endodontic Treatment: Two Case Reports. *J Endod* 2005;31(10):759-63.
98. Kyrgidis A, Arora A, Lyrroudia K, Antoniadis K. Root canal therapy for the prevention of osteonecrosis of the jaws: An evidence-based clinical update. *Aust Endod J* 2010;36:130–33.
99. Goodell G. Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaws and Endodontic Treatment: Two Case Reports. *J Mass Dent Soc* 2006;55(1):44-8.
100. Cvikl B, Agis H, Stögerer K, Moritz A, Watzek G, Gruber R. The response of dental pulp-derived cells to zoledronate depends on the experimental model. *Int Endod J* 2011;44:33–40.
101. Gallego L, Junquera L, Pelaz A, Díaz-Bobes C. Rubber Dam Clamp Trauma During Endodontic Treatment: A Risk Factor of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw? *J Oral Maxillofac Surg* 2011;69:93-95.
102. Corotti MV, Zambuzzi WF, Paiva KB, Menezes R, Pinto LC, Lara VS, et al. Immunolocalization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during apical periodontitis development. *Arch Oral Biol* 2009;54:764–71.
103. Tjäderhane L, Hotakainen T, Kinnunen S, Ahonen M, Salo T. The effect of chemical inhibition of matrix metalloproteinases on the size of experimentally induced apical periodontitis. *Int Endod J* 2007;40:282–9.

104. Moinzadeh AT, Shemesh H, Neirynek NAM, Aubert C, Wesselink PR. Bisphosphonates and their clinical implications in endodontic therapy. *Int Endod J* 2013;46:391–98.



ANEXOS

Anexo A

Guidelines for Publishing Papers in the JOE

Writing an effective article is a challenging assignment. The following guidelines are provided to assist authors in submitting manuscripts.

The JOE publishes original and review articles related to the scientific and applied aspects of endodontics. Moreover, the JOE has a diverse readership that includes full-time clinicians, full-time academicians, residents, students and scientists. Effective communication with this diverse readership requires careful attention to writing style.

General Points on Composition

Organization of Original Research Manuscripts

Manuscripts Category Classifications and Requirements

Available Resources

1. General Points on Composition

1. Authors are strongly encouraged to analyze their final draft with both software (e.g., spelling and grammar programs) and colleagues who have expertise in English grammar. References listed at the end of this section provide a more extensive review of rules of English grammar and guidelines for writing a scientific article. Always remember that clarity is the most important feature of scientific writing. Scientific articles must be clear and precise in their content and concise in their delivery since their purpose is to inform the reader. The Editor reserves the right to edit all manuscripts or to reject those manuscripts that lack clarity or precision, or have unacceptable grammar or syntax. The following list represents common errors in manuscripts submitted to the *JOE*:
2. The paragraph is the ideal unit of organization. Paragraphs typically start with an introductory sentence that is followed by sentences that describe additional detail or examples. The last sentence of the paragraph provides conclusions and forms a transition to the next paragraph. Common problems include one-sentence paragraphs, sentences that do not develop the theme of the paragraph (see also section “c” below), or sentences with little to no transition within a paragraph.
3. Keep to the point. The subject of the sentence should support the subject of the paragraph. For example, the introduction of authors’ names in a sentence changes the subject and lengthens the text. In a paragraph on sodium hypochlorite, the sentence, “In 1983, Langeland et al., reported that sodium hypochlorite acts as a lubricating factor during instrumentation and helps to flush debris from the root canals” can be edited to: “Sodium hypochlorite acts as a lubricant during instrumentation and as a vehicle for flushing the generated debris (Langeland et

al., 1983)." In this example, the paragraph's subject is sodium hypochlorite and sentences should focus on this subject.

4. Sentences are stronger when written in the active voice, *i.e.*, the subject performs the action. Passive sentences are identified by the use of passive verbs such as "was," "were," "could," etc. For example: "Dexamethasone was found in this study to be a factor that was associated with reduced inflammation," can be edited to: "Our results demonstrated that dexamethasone reduced inflammation." Sentences written in a direct and active voice are generally more powerful and shorter than sentences written in the passive voice.
5. Reduce verbiage. Short sentences are easier to understand. The inclusion of unnecessary words is often associated with the use of a passive voice, a lack of focus or run-on sentences. This is not to imply that all sentences need be short or even the same length. Indeed, variation in sentence structure and length often helps to maintain reader interest. However, make all words count. A more formal way of stating this point is that the use of subordinate clauses adds variety and information when constructing a paragraph. (This section was written deliberately with sentences of varying length to illustrate this point.)
6. Use parallel construction to express related ideas. For example, the sentence, "Formerly, endodontics was taught by hand instrumentation, while now rotary instrumentation is the common method," can be edited to "Formerly, endodontics was taught using hand instrumentation; now it is commonly taught using rotary instrumentation." The use of parallel construction in sentences simply means that similar ideas are expressed in similar ways, and this helps the reader recognize that the ideas are related.
7. Keep modifying phrases close to the word that they modify. This is a common problem in complex sentences that may confuse the reader. For example, the statement, "Accordingly, when conclusions are drawn from the results of this study, caution must be used," can be edited to "Caution must be used when conclusions are drawn from the results of this study."
8. To summarize these points, effective sentences are clear and precise, and often are short, simple and focused on one key point that supports the paragraph's theme.
9. Authors should be aware that the *JOE* uses iThenticate, plagiarism detection software, to assure originality and integrity of material published in the *Journal*. The use of copied sentences, even when present within quotation marks, is highly discouraged. Instead, the information of the original research should be expressed by new manuscript author's own words, and a proper citation given at the end of the sentence. Plagiarism will not be tolerated and manuscripts will be rejected, or papers withdrawn after publication based on unethical actions by the authors. In addition, authors may be sanctioned for future publication.

2. Organization of Original Research Manuscripts

Please Note: All abstracts should be organized into sections that start with a one-word title (in bold), *i.e.*, **Introduction**, **Methods**, **Results**, **Conclusions**, etc., and should not exceed more than 250 words in length.

1. **Title Page:** The title should describe the major emphasis of the paper. It should be as short as possible without loss of clarity. Remember that the title is your advertising billboard—it represents your major opportunity to solicit readers to spend the time to read your paper. It is best not to use abbreviations in the title since this may lead to imprecise coding by electronic citation programs such as

PubMed (e.g., use “sodium hypochlorite” rather than NaOCl). The author list must conform to published standards on authorship (see authorship criteria in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at www.icmje.org). The manuscript title, name and address (including email) of one author designated as the corresponding author. This author will be responsible for editing proofs and ordering reprints when applicable. The contribution of each author should also be highlighted in the cover letter.

2. **Abstract:** The abstract should concisely describe the purpose of the study, the hypothesis, methods, major findings and conclusions. The abstract should describe the new contributions made by this study. The word limitations (250 words) and the wide distribution of the abstract (e.g., PubMed) make this section challenging to write clearly. This section often is written last by many authors since they can draw on the rest of the manuscript. Write the abstract in past tense since the study has been completed. Three to ten keywords should be listed below the abstract.
3. **Introduction:** The introduction should briefly review the pertinent literature in order to identify the gap in knowledge that the study is intended to address and the limitations of previous studies in the area. The purpose of the study, the tested hypothesis and its scope should be clearly described. Authors should realize that this section of the paper is their primary opportunity to establish communication with the diverse readership of the *JOE*. Readers who are not expert in the topic of the manuscript are likely to skip the paper if the introduction fails to succinctly summarize the gap in knowledge that the study addresses. It is important to note that many successful manuscripts require no more than a few paragraphs to accomplish these goals. Therefore, authors should refrain from performing extensive review of the literature, and discussing the results of the study in this section.
4. **Materials and Methods:** The objective of the materials and methods section is to permit other investigators to repeat your experiments. The four components to this section are the detailed description of the materials used and their components, the experimental design, the procedures employed, and the statistical tests used to analyze the results. The vast majority of manuscripts should cite prior studies using similar methods and succinctly describe the essential aspects used in the present study. Thus, the reader should still be able to understand the method used in the experimental approach and concentration of the main reagents (e.g., antibodies, drugs, etc.) even when citing a previously published method. The inclusion of a “methods figure” will be rejected unless the procedure is novel and requires an illustration for comprehension. If the method is novel, then the authors should carefully describe the method and include validation experiments. If the study utilized a **commercial product**, the manuscript must state that they either followed manufacturer’s protocol *or* specify any changes made to the protocol. If the study used an ***in vitro* model** to simulate a clinical outcome, the authors must describe experiments made to validate the model, or previous literature that proved the clinical relevance of the model. Studies on **humans** must conform to the Helsinki Declaration of 1975 and state that the institutional IRB/equivalent committee(s) approved the protocol and that informed consent was obtained after the risks and benefits of participation were described to the subjects or patients recruited. Studies involving **animals** must state that the institutional animal care and use committee approved the protocol. The statistical analysis section should describe which tests were used to analyze which dependent measures; p-values

should be specified. Additional details may include randomization scheme, stratification (if any), power analysis as a basis for sample size computation, drop-outs from clinical trials, the effects of important confounding variables, and bivariate versus multivariate analysis.

5. **Results:** Only experimental results are appropriate in this section (*i.e.*, neither methods, discussion, nor conclusions should be in this section). Include only those data that are critical for the study, as defined by the aim(s). Do not include all available data without justification; any repetitive findings will be rejected from publication. All Figures, Charts and Tables should be described in their order of numbering with a brief description of the major findings. Author may consider the use of supplemental figures, tables or video clips that will be published online. Supplemental material is often used to provide additional information or control experiments that support the results section (*e.g.*, microarray data).
6. **Figures:** There are two general types of figures. The first type of figures includes photographs, radiographs or micrographs. Include only essential figures, and even if essential, the use of composite figures containing several panels of photographs is encouraged. For example, most photo-, radio- or micrographs take up one column-width, or about 185 mm wide X 185 mm tall. If instead, you construct a two columns-width figure (*i.e.*, about 175 mm wide X 125 mm high when published in the *JOE*), you would be able to place about 12 panels of photomicrographs (or radiographs, etc.) as an array of four columns across and three rows down (with each panel about 40 X 40 mm). This will require some editing to emphasize the most important feature of each photomicrograph, but it greatly increases the total number of illustrations that you can present in your paper. Remember that each panel must be clearly identified with a letter (*e.g.*, “A,” “B,” etc.), in order for the reader to understand each individual panel. Several nice examples of composite figures are seen in recent articles by Jeger et al (*J Endod* 2012;38:884–888); Olivieri et al., (*J Endod* 2012;38:1007–1011); Tsai et al (*J Endod* 2012;38:965–970). Please note that color figures may be published at no cost to the authors and authors are encouraged to use color to enhance the value of the illustration. Please note that a multipanel, composite figure only counts as one figure when considering the total number of figures in a manuscript (see section 3, below, for maximum number of allowable figures). The second type of figures are graphs (*i.e.*, line drawings including bar graphs) that plot a dependent measure (on the Y axis) as a function of an independent measure (usually plotted on the X axis). Examples include a graph depicting pain scores over time, etc. Graphs should be used when the overall trend of the results are more important than the exact numerical values of the results. For example, a graph is a convenient way of reporting that an ibuprofen-treated group reported less pain than a placebo group over the first 24 hours, but was the same as the placebo group for the next 96 hours. In this case, the trend of the results is the primary finding; the actual pain scores are not as critical as the relative differences between the NSAID and placebo groups.
7. **Tables:** Tables are appropriate when it is critical to present exact numerical values. However, not all results need be placed in either a table or figure. For example, the following table may not be necessary:

% NaOCl	N/Gr oup	% Inhibition of Growth
0.001	5	0
0.003	5	0

0.01	5	0
0.03	5	0
0.1	5	100
0.3	5	100
1	5	100
3	5	100

8. Instead, the results could simply state that there was no inhibition of growth from 0.001-0.03% NaOCl, and a 100% inhibition of growth from 0.03-3% NaOCl (N=5/group). Similarly, if the results are not significant, then it is probably not necessary to include the results in either a table or as a figure. These and many other suggestions on figure and table construction are described in additional detail in Day (1998).
9. **Discussion:** This section should be used to interpret and explain the results. Both the strengths and weaknesses of the observations should be discussed. How do these findings compare to the published literature? What are the clinical implications? Although this last section might be tentative given the nature of a particular study, the authors should realize that even preliminary clinical implications might have value for the clinical readership. Ideally, a review of the potential clinical significance is the last section of the discussion. What are the major conclusions of the study? How does the data support these conclusions
10. **Acknowledgments:** All authors must affirm that they have no financial affiliation (e.g., employment, direct payment, stock holdings, retainers, consultantships, patent licensing arrangements or honoraria), or involvement with any commercial organization with direct financial interest in the subject or materials discussed in this manuscript, nor have any such arrangements existed in the past three years. Any other potential conflict of interest should be disclosed. Any author for whom this statement is not true must append a paragraph to the manuscript that fully discloses any financial or other interest that poses a conflict. Likewise the sources and correct attributions of all other grants, contracts or donations that funded the study must be disclosed
11. **References:** The reference style follows Index Medicus and can be easily learned from reading past issues of the *JOE*. The *JOE* uses the Vancouver reference style, which can be found in most citation management software products. Citations are placed in parentheses at the end of a sentence or at the end of a clause that requires a literature citation. Do not use superscript for references. Original reports are limited to 35 references. There are no limits in the number of references for review articles.

3. Manuscripts Category Classifications and Requirements

Manuscripts submitted to the *JOE* must fall into one of the following categories. The abstracts for all these categories would have a maximum word count of 250 words:

1. CONSORT Randomized Clinical Trial-Manuscripts in this category must strictly adhere to the Consolidated Standards of Reporting Trials-CONSORT- minimum guidelines for the publication of randomized clinical trials. These guidelines can be found at www.consort-statement.org/. These manuscripts have a limit of 3,500 words, [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures and 4 tables*.
2. Review Article-Manuscripts in this category are either narrative articles, or systematic reviews/meta-analyses. Case report/Clinical Technique articles even

when followed by extensive review of the literature will should be categorized as “Case Report/Clinical Technique”. These manuscripts have a limit of 3,500 words, [including abstract, introduction, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures and 4 tables*.

3. Clinical Research (e.g., prospective or retrospective studies on patients or patient records, or research on biopsies, excluding the use of human teeth for technique studies). These manuscripts have a limit of 3,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures and 4 tables*.
4. Basic Research Biology (animal or culture studies on biological research on physiology, development, stem cell differentiation, inflammation or pathology). Manuscripts that have a primary focus on biology should be submitted in this category while manuscripts that have a primary focus on materials should be submitted in the Basic Research Technology category. For example, a study on cytotoxicity of a material should be submitted in the Basic Research Technology category, even if it was performed in animals with histological analyses. These manuscripts have a limit of 2,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures or 4 tables*.
5. Basic Research Technology (Manuscripts submitted in this category focus primarily on research related to techniques and materials used, or with potential clinical use, in endodontics). These manuscripts have a limit of 2,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 3 figures and tables*.
6. Case Report/Clinical Technique (e.g., report of an unusual clinical case or the use of cutting-edge technology in a clinical case). These manuscripts have a limit of 2,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures or tables*.

* Figures, if submitted as multipanel figures must not exceed 1 page length. Manuscripts submitted with more than the allowed number of figures or tables will require approval of the JOE Editor or associate editors. If you are not sure whether your manuscript falls within one of the categories above, or would like to request preapproval for submission of additional figures please contact the Editor by email at jendodontics@uthscsa.edu.

Importantly, adhering to the general writing methods described in these guidelines (and in the resources listed below) will help to reduce the size of the manuscript while maintaining its focus and significance. Authors are encouraged to focus on only the essential aspects of the study and to avoid inclusion of extraneous text and figures. The Editor may reject manuscripts that exceed these limitations.

Available Resources:

Strunk W, White EB. The Elements of Style. Allyn & Bacon, 4th ed, 2000, ISBN 020530902X.

Day R. How to Write and Publish a Scientific Paper. Oryx Press, 5th ed. 1998. ISBN 1-57356-164-9.

Woods G. English Grammar for Dummies. Hungry Minds:NY, 2001 (an entertaining review of grammar).

Alley M. The Craft of Scientific Writing. Springer, 3rd edition 1996 SBN 0-387-94766-3.

Alley M. The Craft of Editing. Springer, 2000 SBN 0-387-98964-1.

Anexo B

Carta de aceite da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UFPE

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 28 de julho de 2010.

Ofício nº 299/2010

Da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof: Danyel Elias da Cruz Perez**
Departamento Clínica e Odontologia Preventiva - CCS
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.027486/2010-25

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, ***“Avaliação do efeito do ácido zoledrônico no início e progressão de lesões periapicais crônicas e no reparo alveolar em ratos.”***

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Observação:

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição,
Animais: Ratos(*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar: sexo:
Machos; Idade: 60(sessenta) dias; Nº de Animais : 75(setenta e cinco).

Atenciosamente,

Maria Teresa Jansen
Profa. Maria Teresa Jansen
Presidente do CEEA

