

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

JÉSSICA DANIELA ANDREIS

O EFEITO DA ROSUVASTATINA NA OSTEONECROSE DA
MANDÍBULA INDUZIDA POR BIFOSFONATOS, ESTUDO EM
MODELO ANIMAL

PONTA GROSSA

2020

JÉSSICA DANIELA ANDREIS

**O EFEITO DA ROSUVASTATINA NA OSTEONECROSE DA
MANDÍBULA INDUZIDA POR BIFOSFONATOS, ESTUDO EM
MODELO ANIMAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco.
Co-orientadora: Profa. Dra. Marcela Claudino da Silva

PONTA GROSSA

2020

A559 Andreis, Jéssica Daniela
O efeito da Rosuvastatina na osteonecrose da mandíbula induzida por Bifosfonatos, estudo em modelo animal / Jéssica Daniela Andreis. Ponta Grossa, 2020.
58 f.

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

Orientador: Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco.

Coorientadora: Profa. Dra. Marcela Claudino da Silva.

1. Bifosfonatos. 2. Osteonecrose. 3. Inibidores de hidroximetilglutaril-coa redutases. 4. Cirurgia bucal. I. Franco, Gilson Cesar Nobre. II. Silva, Marcela Claudino da. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Clínica Integrada. IV.T.

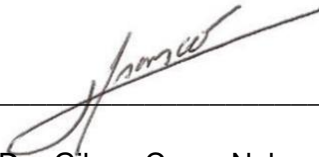
CDD: 617.6

JÉSSICA DANIELA ANDREIS

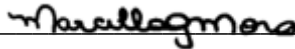
**O efeito da Rosuvastatina na osteonecrose da mandíbula induzida por Bifosfonatos,
estudo em modelo animal**

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

Ponta Grossa, 20 de fevereiro de 2020



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



Prof. Dr^a Marcella Goetz Moro
Universidade de São Paulo



Prof. Dr^a Lea Rosa Chioca Ferro
Universidade Estadual de Ponta Grossa

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a **Deus**, que cuidou de mim desde que eu nasci e tem me ajudado tanto, mesmo que pouco eu mereça. Obrigada Senhor por estar comigo nessa caminhada e cuidar para que tudo fosse conforme a SUA vontade.

A minha mãe **Lindaci**, o amor da minha vida. A mulher mais forte e guerreira, que me sustentou com seu amor, inteligência e oração. Eu sei mãe, que tudo o que fez, foi por nós, seus filhos. O meu maior objetivo é ser como você, mas sei que tenho muito chão para chegar a sua altura. Obrigada por ter cuidado de mim, feito marmitas, escutado meus choros e me abraçado nos momentos mais felizes. Você é parte de tudo isso, aliás, em cada canto dessa dissertação tem um pouco de você e suas palavras que me levaram em frente. Obrigada por ser meu norte, meu fator de motivação, a alegria da minha vida.

A meus irmãos **Jho** e **Di** que cuidaram de mim desde pequena e ainda me rodeiam com sua proteção, carinho e amor. Obrigada pelas chamadas de atenção, pela motivação, pelo patrocínio. Não tenho como agradecer as conversas e conselhos que me deram. Não sou nada sem vocês.

Aos amores da minha vida **Sofia** e **Theo**, que em meio a muitos experimentos, escrita, trabalhos e panorâmicas, estiveram pertinho de mim, obrigada por seu amor tão puro e incondicional.

A minha vó **Ana** e tia **Eveline**. Obrigada por me sustentarem em suas orações, conversas e deliciosas cocadas. Obrigada por me mimarem e cuidarem tanto de mim.

Ao meu namorado **Gustavo**, pela espera sempre paciente, por me compreender, cuidar e me ajudar no que fosse possível. Amo você.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. **Gilson Cesar Nobre Franco**, que além de professor é um amigo, protetor e conselheiro. Obrigada por ter disposto o seu precioso tempo para me ensinar, por ter me motivado e me apresentado a nossa amada Radiologia. Obrigada pelos cursos, pelas caronas, desabafos e principalmente por todo o conhecimento que o senhor nos forneceu. Obrigada por ter lutado por minhas causas e me incluído sempre. Não tenho palavras pra agradecer tudo o que fez por mim. Obrigada, obrigada e obrigada.

A professora Dra **Marcela Claudino**, minha coorientadora, que me ajudou a solucionar problemas impossíveis, obrigada por toda motivação, conhecimento e instrução que me proporcionou. Esse projeto não seria possível sem seu suporte e orientação. Obrigada por sempre estar disponível a nos ajudar, você é meu exemplo de pessoa e profissional, espero ser um dia como você!

Aos professores Dr(a)s: **Fábio André dos Santos, Lea Rosa Chioca Ferro e Letícia Maria Wambier** que disponibilizaram seu tempo para me orientar, me ensinaram sobre a docência e compartilham seu enorme conhecimento comigo. Obrigada por estarem sempre tão dispostos a me ajudar no que fosse preciso.

Aos meus colegas **Leomar, Tayline, Gabriella e Amanda**. Vocês são incríveis. Estiveram comigo em TODOS os momentos dessa pesquisa, desvendando os mistérios da osteonecrose. Estiveram ao meu redor e me mostraram que era possível. Vocês foram meu suporte, meu porto seguro, amigos que se tornaram irmãos. Muito obrigada.

Aos meus queridos coorientados de iniciação científica **Luise, Gabriela e Cassiano**. Como agradecer aos meus pupilos, que deram o sangue por esse projeto, que acreditaram em mim quando eu não acreditava, obrigada por estarem nessa caminhada comigo. Esse trabalho é nosso.

A **Mari e Jo**, que estiveram sempre dispostas a nos ajudar no biotério, cuidadosas com nossos ratinhos e sempre amáveis conosco.

Aos meus amigos **Fábio, Dominique, Cris e Thaís**, que foram parte de minha alegria nesses dois anos, obrigada pelo suporte, conversas, comidas e torcida. A vida seria muito sem graça sem vocês.

Aos meus colegas de laboratório, **Ana, Dani, Gustavo, Lauro, Mari, Lurdes**. Obrigada pela parceria e companheirismo, pela paciência com nosso trânsito para a Radiologia, pelo cuidado e amor com o laboratório que é tão precioso pra nós.

Aos meus colegas da **LODI**, que fizeram parte da minha caminhada dentro do mestrado. Foi um prazer inenarrável estar na companhia de vocês e fazer parte do crescimento profissional de cada um, com certeza aprendemos muito juntos nesse ano que passou.

Ao **Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa** que me deram a oportunidade de crescer profissionalmente e me proporcionaram um ensino de altíssima qualidade.

Aos **colegas de mestrado** que ingressaram nessa jornada comigo.

À **CAPES** pelo apoio financeiro que proporcionou a realização desta pesquisa.

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

**“Espera no Senhor, anima-te, e Ele fortalecerá o teu coração;
espera, pois, no Senhor”**

Salmos 27:14

RESUMO

ANDREIS, JD. **O efeito da Rosuvastatina na osteonecrose da mandíbula induzida por Bifosfonatos, estudo em modelo animal.** [Dissertação de Mestrado em Clínica Integrada]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2020.

O objetivo deste estudo foi analisar o efeito da Rosuvastatina sobre a osteonecrose da mandíbula, por meio do reparo do osso alveolar em modelo animal, após tratamento com Bifosfonatos. Para isso, 48 ratos machos Wistar foram divididos em 4 grupos: C (solução salina via gavagem), RS (Rosuvastatina 3,2mg/Kg via gavagem), BF (ácido zoledrônico 0,1mg/Kg via IP) e BFRS (ácido zoledrônico 0,1mg/Kg IP + Rosuvastatina 3,2 mg/Kg/dia via gavagem). Na 6ª semana, todos os grupos foram submetidos à exodontia e após 6 semanas, foram realizadas as análises clínica e de fluxometria sanguínea para posterior eutanásia. As hemimandíbulas foram removidas e dissecadas para as análises radiográfica e histológica. A estatística foi descritiva e analítica com modelos paramétricos e não paramétricos. O nível de significância adotado foi de $\alpha=0,05$. Em relação à presença de osteonecrose histológica, os grupos C e RS não apresentaram essa condição. Já o grupo BF apresentou tecido necrótico em 100% dos casos enquanto o grupo BFRS apresentou em 75% dos animais. Radiograficamente, os grupos C e RS apresentaram cicatrização gradual (100%), já o grupo BF demonstrou maior quantidade de casos com seqüestros ósseos presentes (80%) comparados ao BFRS (40%), porém sem significância estatística. Nos parâmetros clínicos, não se pôde observar exposição óssea no grupo C e RS. Já no grupo BF foi possível observar maior quantidade de casos (80%) em comparação com o grupo BFRS (40%), porém sem significância. Na análise por laser Doppler e vasos sanguíneos histológicos, o grupo BF apresentou menor fluxometria e vasos sanguíneos, quando comparados com o grupo BFRS e demais grupos, enquanto entre os grupos C e RS, não foi observada diferença estatística. Em relação à severidade da osteonecrose, o grupo BF apresentou predominância por maiores escores, porém não se obteve diferença estatística com o grupo BFRS. Dessa forma, a Rosuvastatina não interferiu na osteonecrose induzida por Bifosfonatos. No entanto, quando associada ao BF, apresentou aumento nos vasos e fluxo sanguíneo local.

Palavras Chave*: Bifosfonatos, Osteonecrose, Cirurgia Bucal, Inibidores de Hidroximetilglutaril-CoA Redutases

*Em acordo com os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) disponível no domínio <http://decs.bvs.br>

ABSTRACT

ANDREIS, JD. **The effect of Rosuvastatin on Bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw, an animal model study.** Dissertação de Mestrado em Clínica integrada]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2020.

The objective of this study was to analyze the effect of Rosuvastatin on osteonecrosis of the jaw, by means of the repair of alveolar bone in an animal model, after treatment with bisphosphonates. For this, 48 male Wistar rats were divided into 4 groups: C (saline via gavage), RS (Rosuvastatin 3.2mg / Kg via gavage), BF (zoledronic acid 0.1mg / Kg via IP) and BFRS (zoledronic acid 0.1mg / Kg IP + Rosuvastatin 3.2mg / Kg / day via gavage). In the 6th week, all groups underwent extraction and after 6 weeks, clinical and blood flow analysis were performed for further euthanasia. The hemimandibles were removed and dissected for radiographic and histological analysis. The statistics were descriptive and analytical with both parametric and non-parametric models. The level of significance adopted was $\alpha = 0.05$. Regarding the presence of histological osteonecrosis, groups C and RS did not present this condition. The BF group presented necrotic tissue in 100% of the cases while the BFRS group presented in 75% of the animals. Radiographically, groups C and RS showed gradual healing (100%), whereas group BF showed a greater number of cases with bone sequestration present (80%) compared to BFRS (40%), but without statistical significance. In clinical parameters, bone exposure could not be observed in group C and RS. In the BF group, it was possible to observe a greater number of cases (80%) compared to the BFRS group (40%), but without significance. In the analysis by laser Doppler and histological blood vessels, the BF group showed lower flowmetry and blood vessels, when compared with the BFRS group and other groups, while between groups C and RS, no statistical difference was observed. Regarding the severity of osteocrosis, the BF group showed a predominance of higher scores, but there was no statistical difference with the BFRS group. Thus, Rosuvastatin did not interfere with bisphosphonate-induced osteonecrosis. However, when associated with BF, it showed an increase in vessels and local blood flow.

Keywords: Bisphosphonates, Osteonecrosis, Surgery Oral, Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase Inhibitors

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura química do pirofosfato e bisfosfonato. Em destaque, a diferença do átomo de oxigênio, na fórmula do Pirofosfato e do átomo de carbono central ligado á cadeia R1 e R2, na fórmula BF. Fonte: Imada (2015) ¹³⁸	3
FIGURA 2	A- Aspecto clínico típico de ONM com osso necrótico exposto e área eritematosa abrangendo a lesão. FONTE: Kishimoto, Noguchi e Takaoka (2019) ⁶¹ . B- Observa-se seqüestro ósseo na região posterior de mandíbula do lado direito. FONTE: Kishimoto, Noguchi e Takaoka (2019) ⁶¹ . C- Corte histológico corado com hematoxilina e eosina demonstrando lacunas vazias sem osteócitos (seta) característico de tecido ósseo necrótico ⁶⁶ . FONTE: Cedida gentilmente pelo Prof. Ms. Leomar Almeida Mecca.....	7
FIGURA 3	Delineamento experimental (S=semana). FONTE: O autor.....	14
FIGURA 4	Sequência de exodontia. A- Primeiro molar inferior esquerdo; B- Sonda posicionada abaixo do ponto de contato entre o primeiro molar e o dente adjacente; C- Luxação em movimentos de sarrilho; D- Sonda posicionada entre as raízes do primeiro molar para movimentos de roda; E- Pós-extração dentária; F- Primeiro molar inferior fora do alvéolo demonstrando suas 3 raízes. FONTE: Mecca (2018) ¹³¹	15
FIGURA 5	Inspeção do alvéolo em 14 dias (grupo C). FONTE: O autor	15
FIGURA 6	Cálculo do valor de RS segundo Reagan-shaw, Nihal e Ahmad (2008) ¹³³	16
FIGURA 7	Avaliação clínica da hemimandíbula esquerda. A seta aponta área de exposição óssea, encontrada nos grupos BF e BFRS. FONTE: O autor.....	16
FIGURA 8	Laser Doppler Blood Flow Monitor. B- Sonda PFS utilizada para análise. FONTE: O autor.....	17
FIGURA 9	Radiografias da hemimandíbula esquerda.....	18
FIGURA 10	A- Área a ser analisada. FONTE: Mecca, 2018 ¹³¹ . B- Área de osteonecrose observada em aumento de 40x (grupo BF). FONTE: O autor.....	19
FIGURA 11	Contagem de vasos sanguíneos na área de reparo. FONTE: O autor.	20
FIGURA 12	Severidade da osteonecrose de acordo com os escores I, II, III e IV. FONTE: O autor.	20

FIGURA 13	Representação gráfica da porcentagem de presença e ausência osteonecrose histológica. A ≠ B indica diferença estatística entre os grupos. Teste qui-quadrado, teste exato de Fischer (P<0,05).....	21
FIGURA 14	Representação gráfica da quantidade de vasos sanguíneos na área de reparo. Análise da variância (ANOVA) e pós teste de Tukey (P<0,05). A ≠ B ≠ C indica diferença estatística entre os grupos.....	22
FIGURA 15	Representação gráfica da porcentagem de presença e ausência de raízes residuais observadas radiograficamente. (Teste qui-quadrado, teste exato de Fischer (P<0,05).....	22
FIGURA 16	A- Representação gráfica da porcentagem de presença e ausência de cicatrização gradual observada radiograficamente. B- Representação gráfica da porcentagem de presença e ausência de seqüestros ósseos observados radiograficamente. A ≠ B indica diferença estatística entre os grupos (Teste qui-quadrado, teste exato de Fischer (P<0,05).....	23
FIGURA 17	Representação gráfica da porcentagem de presença e ausência de exposição de tecido ósseo macroscópico. A ≠ B indica diferença estatística entre os grupos (Teste qui-quadrado, teste exato de Fischer (P<0,05)	23
FIGURA 18	Representação gráfica dos valores da fluxometria sanguínea avaliados por laser Doppler. Análise da variância (ANOVA) e pós teste de Tukey (P<0,05). A ≠ B ≠ C indica diferença estatística entre os grupos.....	24
FIGURA 19	Escore de severidade de ONM. Teste de Kruskal wallis e pós teste de Dumm's.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação dos Bifosfonatos disponíveis, nome comercial, via de administração, potência anti-reabsortiva e suas respectivas indicações. FONTE: Adaptado de Fernandes et al (2015), Ruggiero et al (2014) ⁷ , Scarpa et al (2010), da Costa Chaves et al (2018).....	04
Tabela 2	Classificação dos estágios da ONM relacionando suas características clínicas e radiográficas. FONTE: Adaptado de Ruggiero et al (2014) ⁷	07

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise da variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARRIVE	Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments
ASCO	American Society of Clinical Oncology
AT	Atrovastatina
ATP	Adenosina trifosfato
AZ	Ácido zoledrônico
BFs	Bifosfonatos
BMPs	Proteínas Morfogenéticas Ósseas
CG	Cicatrização gradual
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação animal
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ES	Estatinas
HE	Hematoxina e eosina
HMG-CoA	Hidroximetilglutaril-CoA
ISOO	International Society of Oral Oncology
IP	Intraperitoneal
LDL	Lipoproteína De Baixa Densidade
MASCC	Multinational Association of Supportive Care in Cancer
NBF	Bifosfonatos nitrogenados
ONM	Osteonecrose dos maxilares
ONMB	Osteonecrose dos maxilares induzida por bifosfonatos
PCR	Proteína C-reativa
PS	Proteínas séricas

PT	Proteínas totais
RANKL	Ligante Fator Nuclear-Kb
RS	Rosuvastatina
RR	Raízes residuais
SO	Sequestros ósseos
SUS	Sistema único de Saúde
TC	Tomografia computadorizada
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VO	Via Oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 ANIMAIS E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	26
4.2 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO AMOSTRAL	26
4.3 MANIPULAÇÃO ANIMAL.....	26
4.4 DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	27
4.5 MODELO DE OSTEONECROSE	27
4.6 GAVAGEM DE SOLUÇÃO SALINA E ROSUVASTATINA	29
4.7 ANÁLISE CLÍNICA.....	29
4.8 ANÁLISE DO FLUXO SANGUÍNEO LOCAL (LASER DOPPLER)	30
4.9 PREPARO DAS AMOSTRAS	31
4.10 ANÁLISE RADIOGRÁFICA.....	31
4.11 ANÁLISE HISTOLÓGICA	32
4.12 CLASSIFICAÇÃO DA SEVERIDADE DE ONM	33
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
5 RESULTADOS	35
5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA	35
5.2 ANÁLISE RADIOGRÁFICA.....	36
5.3 ANÁLISE CLÍNICA.....	37
5.4 ANÁLISE FLUXOMETRIA SANGUÍNA.....	38
5.5 SEVERIDADE DA OSTEONECROSE.....	39
6 DISCUSSÃO	40
7 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXO A- Comitê de Ética de Experimentação Animal (031/2018)	58

1 INTRODUÇÃO

Os antirreabsortivos são fármacos que agem na manutenção e homeostase do tecido ósseo em pacientes com desordens no metabolismo dessas estruturas, tais como: osteoporose, doenças ósseas metastáticas e hipercalcemia maligna¹. Os Bifosfonatos (BFs) são os principais representantes dessa classe, comprometendo a morfologia e atuação dos osteoclastos, bem como na indução de apoptose destas células². Além disso, estudos demonstram que sua função antitumoral e antiangiogênica pode permitir sua utilização como adjuvante no tratamento de neoplasias^{3,4,5,6}. Devido a uma vasta gama de indicações, os BFs estão sendo cada vez mais prescritos, podendo chegar até 190 milhões de prescrições por ano em todo mundo⁷. No Brasil, os bisfosfonatos são aprovados pela ANVISA e disponibilizados pelo Sistema único de Saúde (SUS). Apesar de seu efetivo potencial terapêutico, os BFs estão relacionados com o desenvolvimento da osteonecrose dos maxilares (ONMB)⁸. Apesar de sua nomenclatura, essa condição ocorre mais frequentemente na mandíbula comparado com a maxila ou em ambos ao mesmo tempo².

A ONMB é definida pela *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* por uma área de osso exposto há mais de 8 semanas, na região maxilofacial, em pacientes tratados com BFs sem história de radioterapia ou doença metastática nos maxilares⁸. Estudos epidemiológicos apontam que sua incidência pode atingir até dez mil pacientes por ano sob terapia endovenosa, sendo de 0,7% a 6,7% em pacientes oncológicos^{9,10,11}. A etiopatogenia da ONM está baseada na inibição da remodelação, reabsorção óssea e atividade antiangiogênica promovida pelos BFs. Além de componentes inflamatórios e infecciosos locais, que associados ou não, levam ao desenvolvimento da osteonecrose⁸. No entanto, o protocolo de tratamento decisivo para esse efeito adverso ainda não foi estabelecido¹². Por isso, como uma condição potencialmente debilitante, diversos estudos estão sendo conduzidos visando o desenvolvimento de estratégias preventivas ou terapêuticas voltadas para a ONM^{13,14,15}. Essas abordagens envolvem um contexto multidisciplinar, com eliminação de fatores de risco para a osteonecrose¹⁵. Assim, a prevenção da ONM é considerada essencial, diminuindo o risco do seu desenvolvimento de 3% para 0,7% quando estas medidas são tomadas¹⁶.

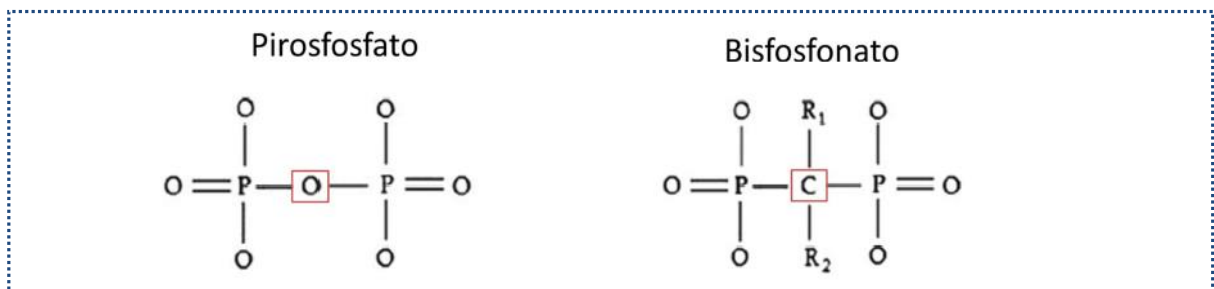
Nesse contexto, as estatinas, um medicamento com função hipolipemiante, possuem efeitos pleiotrópicos no tecido ósseo, que poderiam ser utilizados na prevenção da ONM ou na redução de sua severidade^{17,18,19}. Dentre a nova geração dessa classe, a Rosuvastatina (RS) possui potencial anti-inflamatório, propriedades antioxidantes e angiogênicas, e, ainda, pode aumentar a diferenciação de osteoblastos e proporcionar maior deposição de matriz óssea^{20,21,22}. Além disso, seu efeito antimicrobiano pode ser interessante perante o componente infeccioso da ONM²³. Dessa forma, é possível que a RS promova efeitos benéficos sobre o tecido ósseo, vasos sanguíneos e inflamação local, apresentando potencial terapêutico sobre a ONM.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIFOSFONATOS

Os Bifosfonatos (BFs) foram utilizados pela primeira vez como antirreabsortivos nas doenças ósseas há 40 anos²⁴. Estruturalmente, são compostos análogos ao ácido pirofosfórico, um inibidor endógeno da reabsorção do tecido ósseo²⁵. Sua estrutura química difere deste por apresentar um átomo de carbono ligado a duas moléculas de fosfato, o que confere maior estabilidade ao composto²⁶ (FIGURA 1). A potência dos BFs depende de suas cadeias laterais (R1 e R2), que podem ser nitrogenadas ou não².

FIGURA 1: Estrutura química do pirofosfato e bisfosfonato. Em destaque, a diferença do átomo de oxigênio, na fórmula do Pirofosfato e do átomo de carbono central ligado à cadeia R1 e R2, na fórmula BF.



FONTE: Imada (2015)¹³⁸.

O clodronato e o etidronato são exemplos de BFs com ausência de nitrogênio. Já o ácido zoledrônico, alendronato de sódio, pamidronato de sódio, ibandronato de sódio e risedronato são os representantes nitrogenados e possuem maior potência^{7,27}. Estes últimos componentes podem ser divididos em alquil-amino bifosfonatos (pamidronato, alendronato e ibandronato) e cadeia nitrogenada heterocíclica contendo bifosfonatos, representados pelo risendronato e zolendronato^{28,29} (TABELA 1).

Tabela 1: Relação dos Bifosfonatos disponíveis, nome comercial, via de administração, potência anti-reabsortiva e suas respectivas indicações.

Bifosfonatos	Nome comercial	Vias de administração	Potência anti-reabsortiva	Indicações
Ácido zoledrônico	Aclasta®	Intravenosa	>10000	Osteoporose
	Zometa®			Hipercalemia maligna, mieloma múltiplo, metástase óssea
Alendronato de Sódio	Fosamax®	Oral	>100- < 1000	Osteoporose
Ibandronato de sódio	Bonviva®	Oral	>1000- <10000	Osteoporose
Pamidronato de sódio	Aredia®	Intravenosa	~ 100	Hipercalemia maligna, mieloma múltiplo, metástase óssea de câncer de mama, próstata e pulmão
Risedronato de sódio	Actonel®	Oral	>1000-<10000	Osteoporose

Adaptado de Fernandes et al (2005) Scarpa et al (2010), Ruggiero et al (2014), Chaves et al (2018)

FONTE: Adaptado de Fernandes et al (2015), Ruggiero et al (2014), Scarpa et al (2010), da Costa Chaves et al (2018).

Devido a diferentes cadeias, os bifosfonatos nitrogenados (NBF) e os não nitrogenados possuem mecanismos de ação distintos. Neste último grupo, ocorre a metabolização celular em um derivado da molécula de adenosina trifosfato (ATP). Isso dificulta os mecanismos de ação do osteoclasto, interferindo em sua função e levando a apoptose desta célula³⁰. Nos NBF, ocorre a inibição da enzima farnesil difosfato sintase, dificultando a prenilação de proteínas na via metabólica do mevalonato. Devido a isso, funções vitais dos osteoclastos são comprometidas, como o tráfego vesicular e rompimento de sua borda em escova, essencial para sua função no tecido ósseo². Além disso, os BFs podem ocasionar a apoptose dessa célula e aumento da densidade mineral óssea^{31,32}. Em células tumorais, os NBF inibem a proliferação, migração e invasão, além de induzir a apoptose dessas estruturas³³.

Sua ação farmacológica é caracterizada pela dificuldade de penetração na membrana celular, o que pode explicar a baixa absorção intestinal dos BFs^{26,34}. Entretanto, possui alta afinidade por hidroxapatita e geralmente é depositado em sítios de remodelação óssea^{24,35}. A meia vida dos BFs no osso é variável, podendo chegar até 10 anos, permanecendo até que esse tecido seja reabsorvido^{24,36,37}. Quando não distribuída para o tecido ósseo, sua eliminação geralmente ocorre nos rins³².

Apesar de apresentarem potencial clínico na terapêutica de doenças ósseas, os BFs estão relacionados a efeitos adversos, como: comprometimento do trato gastrointestinal, fratura atípica do fêmur, hipocalcemia, hiperpatireoidismo secundário, dor musculoesquelética, câncer de esôfago e a osteonecrose dos maxilares induzida por bifosfonatos (ONMB)^{38,39,40}.

2.2 OSTEONECROSE DOS MAXILARES INDUZIDA POR BIFOSFONATOS

A osteonecrose dos maxilares (ONM) é a exposição do tecido ósseo com ausência de cicatrização e reparo local. O primeiro relato dessa condição foi em 2003, sendo atribuída como efeito colateral dos Bifosfonatos (BFs)⁴¹. No complexo maxilo-mandibular, esse fármaco se concentra em uma grande proporção, devido ao maior *turnover* ósseo da região⁴². Sua fisiopatologia ainda não é completamente conhecida, mas explica-se por três teorias ou a associação delas: como inibidores da reabsorção óssea, os BFs diminuem a função e sobrevivência dos osteoclastos comprometendo a reabsorção da matriz mineral do tecido ósseo⁴³. Com isso, não há liberação de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), que induzem a diferenciação dos osteoblastos, células fundamentais na neoformação do tecido ósseo^{44,45}. Portanto, há uma diminuição na renovação óssea³⁰.

Além disso, há o aumento dos componentes inflamatórios e infecciosos na ONM induzida por BFs. Bactérias da cavidade oral como *Actinomyces*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp*, *Fusobacterium*, *Eikenellae Bacillus* podem ser observadas em áreas osteonecróticas, demonstrando uma potencial relação infecciosa com essa condição^{46,47}. Devido a isso, há o aumento do infiltrado inflamatório pela maior liberação de citocinas circulantes e disfunção das proteases da matriz^{48,49}. Da mesma maneira, pode-se associar o comprometimento da resposta imune do organismo, pela possibilidade da ação dos BFs nos macrófagos, comprometendo sua função e diferenciação celular^{30,50}.

Ainda, o componente antiangiogênico dos BFs está relacionado com a ONM. Esse fenômeno explica-se pela diminuição acentuada nos níveis circulantes do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e inibição de células endoteliais vasculares^{49,51}. A formação de neovasos sanguíneos permite o transporte de substâncias fundamentais para o reparo ósseo normal, portanto influenciam na homeostase óssea^{7,52,53}.

Além de sua patogênese, fatores de risco podem estar associados com a ONM. Os fatores sistêmicos englobam: quimioterapia, uso de corticóides e doenças como diabetes ou cardiovasculares. Já os fatores locais abrangem a extração dentária, doença periodontal, lesões de causa endodôntica e manipulação geral do tecido ósseo^{7,9,54}. Além disso, o tempo de uso, dose do medicamento desencadeante e hábitos como o tabagismo estão relacionados com a ONM induzida por BFs^{9,11}.

Atualmente, devido à associação da ONM com outros medicamentos como antirreabsortivos, inibidores antiangiogênicos e do ligante fator nuclear-kB (RANKL), há uma tendência à mudança da nomenclatura para 'osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos'⁵⁵. Isso se deve ao aumento do uso dos medicamentos antiangiogênicos, geralmente antitumorais, que levam a um crescente número de casos relatados^{7,55,56}.

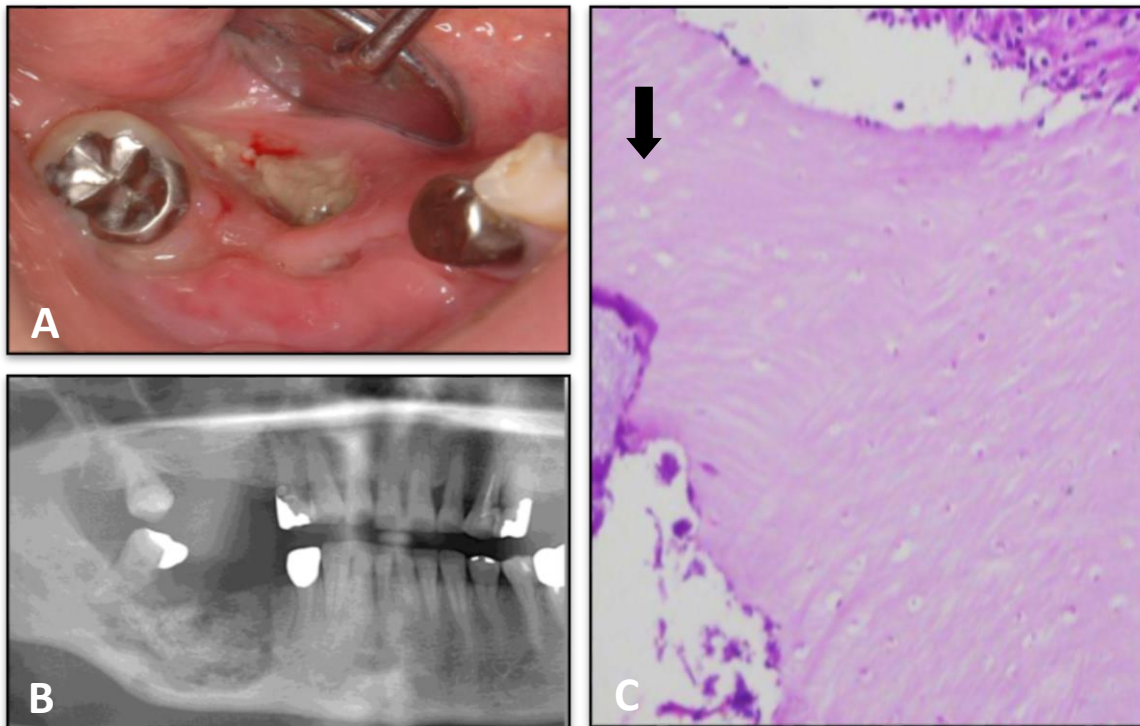
Em relação às características clínicas da ONM, as áreas necróticas típicas (FIGURA 2), podem manter-se assintomáticas por longos períodos, tornando-se sintomáticas após infecção secundária dos tecidos adjacentes^{10,57}. Durante o período clinicamente indetectável, ou seja, quando não se pode observar exposição do tecido ósseo, em alguns casos, é possível observar úlcera, edema, dor, mobilidade dentária e eritema^{10,58,59}. Os sinais e sintomas tardios compreendem: dor em diversas regiões como: cabeça, ouvido e músculos locais, além de promover abertura bucal limitada, fístula, sinusite e fraturas patológicas^{7,157}. Outros sinais como halitose e supuração são frequentes nos casos de osso necrótico exposto⁵⁵. Isso demonstra o potencial debilitante da ONM induzido por BFs, afetando diretamente a qualidade de vida do paciente^{7,60}. Ruggiero et al. (2014)⁷ propôs estágios da ONM, compreendendo seus aspectos clínicos e radiográficos (TABELA 2).

Tabela 2: Classificação dos estágios da ONM relacionando suas características clínicas e radiográficas.

Estágio	Característica Clínica	Característica radiográfica
Pacientes de risco	Ausência de osso necrótico em pacientes em tratamento com Bifosfonatos.	Ausência de sinais radiográficos.
Estágio 0	Sinais clínicos inespecíficos sem exposição de osso necrótico (fístula e dor sem explicações periodontais/odontogênicas, mobilidade dentária não associada a doença periodontal).	Aumento da densidade óssea, ausência de cicatrização alveolar, esclerose, espessamento da lamina dura.
Estágio 1	Presença de osso necrótico em pacientes sem sintomatologia e infecção.	Aumento da densidade óssea, ausência de cicatrização alveolar, esclerose, espessamento da lamina dura.
Estágio 2	Presença de osso necrótico infectado associado a áreas de eritema e sintomatologia dolorosa.	Aumento da densidade óssea, ausência de cicatrização alveolar, esclerose, espessamento da lamina dura.
Estágio 3	Presença de osso necrótico infectado e doloroso que apresente pelo menos um dos itens: extensão para além do osso alveolar, fístula extraoral, fraturas patológicas, osteólise estendendo-se até a borda inferior da mandíbula ou do seio maxilar ou comunicação oral/antral/nasal.	Aumento da densidade óssea, ausência de cicatrização alveolar, esclerose, espessamento da lamina dura, fraturas, trajeto de fístula.

FONTE: Adaptado de Ruggiero et al (2014)⁷.

FIGURA 2: A- Aspecto clínico típico de ONM com osso necrótico exposto e área eritematosa abrangendo a lesão. B- Observa-se seqüestro ósseo na região posterior de mandíbula do lado direito. C- Corte histológico corado com hematoxilina e eosina demonstrando lacunas vazias sem osteócitos (seta) característico de tecido ósseo necrótico.



FONTE: A,B- Kishimoto, Noguchi e Takaoka⁶¹ (2019); C- Cedida gentilmente pelo Prof. Ms. Leomar Emanuel Almeida Mecca.

A estratégia diagnóstica mais sensível baseia-se no exame clínico e história pregressa. O exame radiográfico auxilia na detecção de áreas osteonecróticas indetectáveis clinicamente⁶⁹. As hipóteses diagnósticas incluem sinusite, osteíte alveolar, doenças periodontais e displasia cemento-óssea¹⁰.

Radiograficamente, a ONM se manifesta através da alteração na morfologia/trabeculado do tecido ósseo: presença de sequestros ósseos (FIGURA 2), espessamento da lâmina dura, aumento da densidade/estreitamento do trabeculado ósseo e fraturas patológicas locais associadas à área necrótica^{10,62}. Nas radiografias periapicais é possível observar características da ONM que necessitam de maior detalhamento, como o espessamento da lâmina dura⁶³. Já a radiografia panorâmica abrange o complexo maxilo-mandibular, onde é possível observar o comprometimento do seio maxilar, envolvimento do canal mandibular, osteólise, lesões escleróticas e fraturas patológicas^{10,62}. Além de permitir uma visualização mais abrangente, o exame 3D, como a tomografia computadorizada (TC), possibilita a percepção precoce da ONM. Isso se deve ao aumento da densidade do trabeculado ósseo, que muitas vezes não pode ser percebida em radiografias panorâmicas, porém são visualizadas na TC⁶⁴. A ressonância magnética, especialmente a de contraste T1, diminui a intensidade do sinal da medula óssea, e também pode permitir a detecção precoce da ONM^{62,64,65}.

Apesar da biópsia geralmente não ser utilizada como critério diagnóstico, podemos observar o osso necrótico pela presença de lacunas vazias com ausência de células ósseas. Essa condição é observada por mais do que 8 lacunas vazias, adjuntas, sem osteócitos^{45,66}(FIGURA 2). Devido ao uso dos BFs, os osteoclastos apresentam-se em menor quantidade e pode-se observar microrganismos e células inflamatórias na região. O potencial infeccioso da ONM deve-se a lesão pré-existente ou contaminação do sítio após intervenção local^{67,68}. Além disso, estudos afirmam a redução de vasos sanguíneos na extensão do tecido comprometido pela doença⁶⁷.

O protocolo terapêutico definitivo para esse efeito adverso está parcialmente estabelecido^{10,12}. Os tratamentos variam de acordo com o profissional cirurgião-dentista e sua experiência clínica⁷. Essa escolha terapêutica pode variar entre conservadora e radical, sendo que vários fatores podem influenciar essa decisão, como: idade, expectativa de vida, nível prognóstico, doença preexistente, tamanho e

estágio da ONM induzida por BFs¹⁰. O desbridamento, curetagem, antibioticoterapia, eliminação de doenças ativas e desinfecção/limpeza da lesão podem impedir sua progressão, porém existem evidências da maior eficiência do tratamento cirúrgico (desbridamento/ressecção)⁶¹. No entanto, há controvérsias sobre a terapia cirúrgica nos estágios iniciais da ONM induzida por BFs⁶¹. Dessa forma, geralmente a abordagem conservadora é instituída primeiramente, por proporcionar a remissão dos sintomas e alívio por longo período^{70,71}.

Novos tratamentos estão surgindo na literatura, como o uso de teriparatida, pentoxifilina e tocoferol, ozônio tópico, transplantes, câmara hiperbárica e laser, e podem estar associados ou não a outras estratégias conservadoras ou cirúrgicas⁷²⁻⁷⁸. Diretrizes da Multinational Association of Supportive Care in Cancer (MASCC), International Society of Oral Oncology (ISOO) e American Society of Clinical Oncology (ASCO) incentivam a abordagem multiprofissional da osteonecrose dos maxilares, incluindo cirurgião-dentista e médico especialista, a fim de promover o tratamento adequado e otimizado ao paciente⁷¹. Em adição, outros medicamentos têm demonstrado efeitos pleiotrópicos no tecido ósseo e angiogênese, como as estatinas. Por isso, sua ação está sendo investigada e tem demonstrado bons resultados na osteonecrose induzida pelo calor e por glicocorticoides^{79,80}.

2.3 ESTATINAS

Descobertas em 1987 como metabólitos de fungos, as estatinas (ES) são importantes redutores do colesterol e possuem potencial na prevenção de doenças cardiovasculares^{81,82}. Seu mecanismo de ação é através da inibição da enzima hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) redutase que envolve a regulação hepática da lipoproteína de baixa densidade (LDL)⁸³. Os representantes dessa classe dividem-se em semissintéticos (sinvastatina e pravastatina) e sintéticos (lovastatina, fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina e pitavastatina)^{81,83,84}.

Além de sua ação protetiva cardiovascular, as estatinas possuem efeitos pleiotrópicos. Seu potencial anti-inflamatório pode ser explicado pela redução da migração de neutrófilos ao inibir a atividade da Rho quinase (proteína quinase)¹⁸. Além disso, atua na supressão de citocinas pró-inflamatórias e na redução da proteína C reativa (PCR)^{85,86,87}. Ainda, pode aumentar os neovasos sanguíneos, por permitirem

a expressão precoce dos fatores que ativam a angiogênese, VEGF e BMPs, também envolvidos na formação óssea^{19,88}.

No tecido ósseo, as ES aumentam a diferenciação de osteoblastos através da estimulação de BMP-2⁸⁹. Dessa forma, o uso dessa droga poderia contribuir para incrementos significativos na densidade mineral óssea, devido ao aumento da osteogênese ou supressão da apoptose dos osteoblastos⁹⁰. Outro processo afetado pelas ES é a inibição da osteoclastogênese, através da regulação das vias de sinalização dos marcadores osteoprotegerina e RANK/RANKL⁹¹. Além disso, as ES possuem potencial de redução do estresse oxidativo⁹². Este fenômeno afeta a diferenciação de células ósseas e pode comprometer o processo de mineralização⁹³.

Outro componente interessante é seu efeito antimicrobiano. Em um estudo retrospectivo entre pacientes hospitalizados com hemoculturas positivas para *S. aureus*, as ES demonstraram efeitos benéficos em relação à redução da taxa de mortalidade nos indivíduos tratados com ES²³. Esse efeito deve-se a inibição da invasão de células endoteliais humanas por *S. aureus*, modificação na formação biofilme por essa bactéria e aumento da depuração de *S. aureus* por células fagocitárias^{94,95,96}. Em adição, observa-se a ação das ES em outros microrganismos bucais como *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, devido possivelmente a depuração do sítio infectado e apoptose bacteriana^{97,98}.

A terapia com as estatinas são bem toleradas, mas possuem efeitos adversos como comprometimento muscular e hepatotoxicidade, que se deve a maior exposição da droga devido a outros medicamentos utilizados simultaneamente^{99,100}.

2.4 ROSUVASTATINA

Dentre a nova geração das estatinas, a Rosuvastatina (RS) é um composto completamente sintético representado pelo sal de cálcio do ácido hidroxil-ativo¹⁰¹. Sua potência hipolipemiante é maior do que outras ES, visto que essa droga possui efeito equivalente a doses 7 vezes superiores a sinvastatina¹⁰². Esse fármaco é indicado no tratamento de hiperlipidemia primária, dislipidemia mista, hipercolesterolemia e na limitação da progressão da placa aterosclerótica¹⁰¹. Possui alta afinidade ao local ativo da enzima HMG-COA redutase, comprometendo sua ligação e reduzindo a síntese de colesterol nos tecidos hepáticos¹⁰³.

Diferente da maioria das ES, a RS possui propriedades hidrofílicas. Isso confere maior seletividade ao fígado e rápida eliminação através da secreção biliar/rins, diminuindo a incidência de interações com outros medicamentos^{104,105,106}. Outra diferença é sua maior meia-vida terminal comparada com outras ES¹⁰⁷.

Assim como sua classe medicamentosa, a RS possui efeitos pleiotrópicos. Em relação ao seu potencial anti-inflamatório, esse fármaco destaca-se em comparação com a atorvastatina (ATV), observados em parâmetros clínicos da doença periodontal¹⁰⁸. Esse efeito deve-se, provavelmente, a maior ação anti-inflamatória da RS do que ATV, avaliada através do PCR^{109,110}. Além disso, observou-se a ação da RS na diminuição de citocinas pró-inflamatórias e migração de leucócitos^{111,112,113}. Em adição, a RS estimula as células progenitoras endoteliais e contribuem com a neovascularização^{20,114,115,116}. Estudos *in vivo* demonstram aumento no VEGF após administração oral de RS^{117,118}.

A influência dessa droga no tecido ósseo pode ser observada através do seu efeito benéfico no reparo de defeitos em calvária de rato¹¹⁹. Outra demonstração de sua ação é vista no maior preenchimento ósseo quando a RS é utilizada topicamente na doença periodontal¹²⁰. Além disso, a RS pode aumentar a diferenciação dos pré-osteoblastos e os níveis séricos de osteocalcina^{22,121,122}. Nos osteoclastos, pode inibir sua função devido à diminuição de Interleucina-6 pelos osteoblastos¹²³. Ainda, possui potencial redutor do estresse oxidativo que pode trazer benefícios ao tecido ósseo^{124,125}.

Semelhante a sua classe, a RS possui atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas e gram-positivas¹²⁶. Este efeito pode ser decorrente do comprometimento das funções dos microrganismos, pela ligação desse fármaco e posterior fragmentação de estruturas da superfície celular¹²⁷.

Efeitos colaterais como rabdomiólise, nefropatia, proteinúria e insuficiência renal estão relacionados a doses de RS. Entretanto, comparada com as outras ES, não possui maior risco desses efeitos¹²⁸.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar se a Rosuvastatina possui efeito sobre a osteonecrose da mandíbula, por meio do reparo do osso alveolar em ratos previamente tratados com bifosfonatos e submetidos à exodontia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar se:

- A Rosuvastatina interfere na incidência da osteonecrose da mandíbula induzida por Bifosfonatos.
- A Rosuvastatina possui efeito na severidade da osteonecrose da mandíbula induzida por Bifosfonatos.
- A Rosuvastatina interfere no fluxo e quantidade de vasos sanguíneos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo em modelo animal foi realizado de Julho de 2018 a Janeiro de 2019, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

4.1 ANIMAIS E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal sob o número de protocolo 031/2018. O presente experimento utilizou 48 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), provenientes do biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) (Ponta Grossa/Paraná-Brasil), com tempo de vida em torno de 90 dias. O peso dos animais variou entre 250 a 400 gramas.

4.2 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO AMOSTRAL

A determinação do número de animais foi baseada na análise estatística pelo Software GPower 3.1 (média/desvio padrão – Teste: avaliação histológica) de dados da literatura com metodologia semelhante¹²⁹. Neste sentido, assumindo um tamanho de efeito (d de Cohen) de 3.6, com um poder estatístico de 95% e um nível de significância de 5%, obtivemos um “n” amostral mínimo de 10 animais/grupo. Considerando uma possível perda da amostra durante a execução do experimento (alta taxa de mortalidade), foi solicitado um total de 12 animais/grupo.

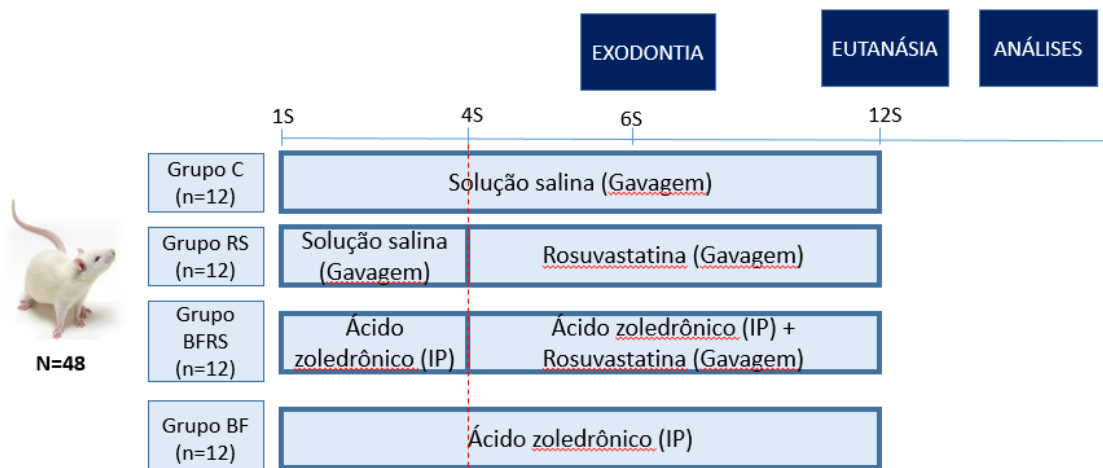
4.3 MANIPULAÇÃO ANIMAL

A manipulação animal, foi respaldada pela lei nº 11794, de 8 de outubro de 2008. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno, revestidas com maravalha e após as exodontias, com papel Kraft. O revestimento foi alterado para evitar o acúmulo de maravalha no alvéolo, que poderia afetar o reparo por causas extrínsecas ao estudo. As gaiolas foram mantidas em estantes verticais no biotério da UEPG, em regime 12/12h (claro e escuro), com temperatura controlada de 25°C, alimentados com dieta comercial normoproteica e água natural (*ad libitum*), até o início e finalização do experimento, seguindo as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments).

4.4 DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram divididos 48 animais em 4 grupos (n=12) sendo que o grupo C representa o controle com ausência de ONM. O grupo RS possibilita a observação do reparo ósseo alveolar diante da administração oral de Rosuvastatina, sendo iniciada a gavagem 2 semanas antes da exodontia e 6 semanas após. Já no grupo BF, a osteonecrose dos maxilares foi induzida sem profilaxia associada. Dessa forma, foi aplicado ácido zoledrônico 6 semanas antes da exodontia e mantida 6 semanas após. No grupo BFRS, a ONM foi induzida a partir de 6 semanas de ácido zoledrônico antes e após a exodontia com adição da profilaxia da Rosuvastatina iniciada duas semanas antes da cirurgia e 6 semanas após (FIGURA 3).

FIGURA 3: Delineamento experimental (S= semana).



FONTE: O autor.

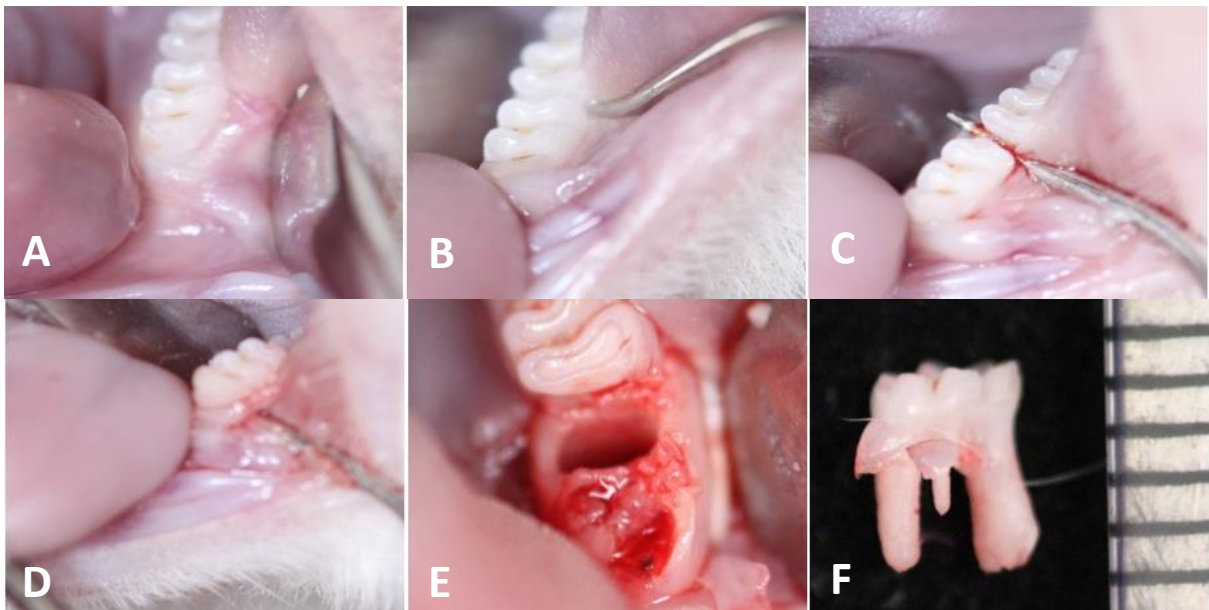
4.5 MODELO DE OSTEONECROSE

Para obtenção do modelo de ratos com osteonecrose, foi escolhido o método descrito por Córdova et al.⁴⁵ (2016). Neste estudo administrou-se 2 aplicações semanais de um medicamento pertencente a classe dos Bifosfonatos, o ácido zoledrônico (AZ) (Sigma-Aldrich, EUA) 0,1 mg/kg, pela técnica intraperitoneal (IP), por 12 semanas. Foi realizado jejum de 2 horas antes da aplicação do medicamento¹³⁰.

Após o transcorrer da terapia farmacológica, sob efeito de anestesia geral, os animais foram submetidos à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo (FIGURA 4). Na ferida cirúrgica, foi utilizada uma broca de aço inoxidável de 1.0 mm de diâmetro a 15.000 rpm sob contínua irrigação com solução salina, com o objetivo de

remover possíveis fragmentos radiculares e aumentar a exposição óssea⁸. O defeito foi padronizado a partir de stop de silicone adaptado na ponta ativa da broca. Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam dose única de dipirona sódica (Dipirona Ibase®; Laboratório Ibase Ltda, Porto Alegre, RS, Brasil) e foram mantidos aquecidos e observados até o fim da anestesia.

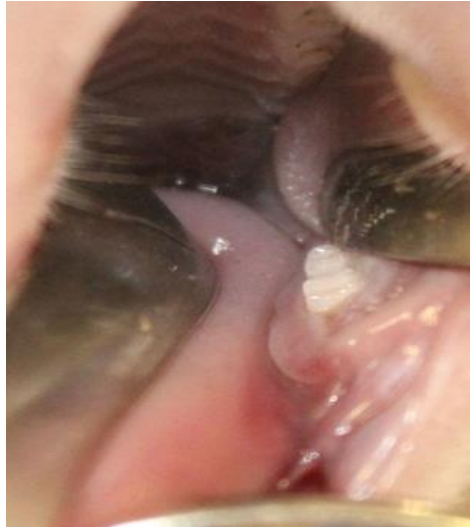
FIGURA 4: Sequência de exodontia. A- Primeiro molar inferior esquerdo; B- Sonda posicionada abaixo do ponto de contato entre o primeiro molar e o dente adjacente; C- Luxação em movimentos de sarrilho; D- Sonda posicionada entre as raízes do primeiro molar para movimentos de roda; E- Pós-extração dentária; F- Primeiro molar inferior fora do alvéolo demonstrando suas 3 raízes.



FONTE: Mecca¹³¹ (2018).

Após 14 dias, os animais foram anestesiados e o sítio cirúrgico inspecionado, juntamente com irrigação branda do local, a fim da retirada de resíduos alimentares que poderiam promover o atraso no reparo normal do alvéolo (FIGURA 5).

FIGURA 5: Inspeção do alvéolo em 14 dias (grupo C).



FONTE: O autor.

Posterior a cirurgia, o medicamento foi aplicado por mais 6 semanas, com mesma dose e posologia, completando a terapia farmacológica de 12 semanas de ácido zoledrônico sugerida por Córdova et al.⁴⁵ (2016).

4.6 GAVAGEM DE SOLUÇÃO SALINA E ROSUVASTATINA

Foi administrado 0,5 ml/dia de solução salina no grupo C e Rosuvastatina 3,2 mg/kg/dia no grupo RS e BF+RS por oito semanas¹¹⁹. Essa dosagem fica próximo dos 40mg/dia administrados em humanos¹³² confirmado a partir dos cálculos sugeridos por Reagan-shaw, Nihal e Ahmad¹³³ (2008) (FIGURA 6).

FIGURA 6: Cálculo do valor de RS.

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

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

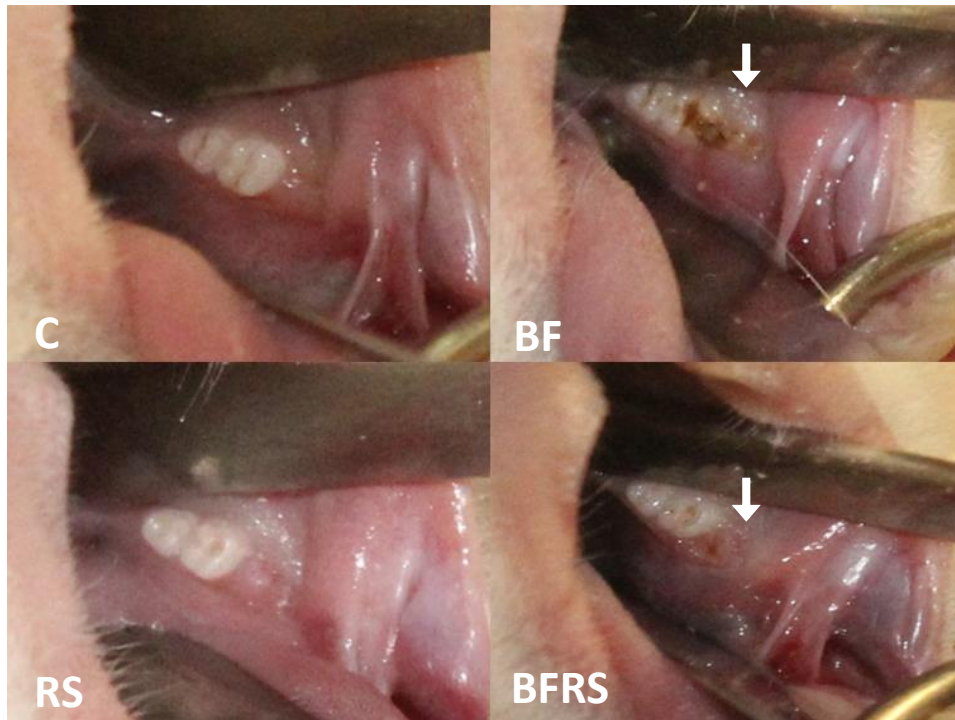
FONTE: Reagan-shaw, Nihal e Ahmad¹³³ (2008).

4.7 ANÁLISE CLÍNICA

Posteriormente ao tempo experimental (90 dias), ao mesmo dia da eutanásia, os animais foram anestesiados e registrados (Fotografia digital com padronização dos parâmetros: 1) distância: lente - animal, 2) luminosidade local e 3) configurações

técnicas: resolução / abertura / velocidade de disparo / ISO) para análise macroscópica do alvéolo, onde foram analisadas a presença/ausência de exposição óssea (FIGURA 7).

FIGURA 7: Avaliação clínica da hemimandíbula esquerda. A seta aponta área de exposição óssea, encontrada nos grupos BF e BFRS.



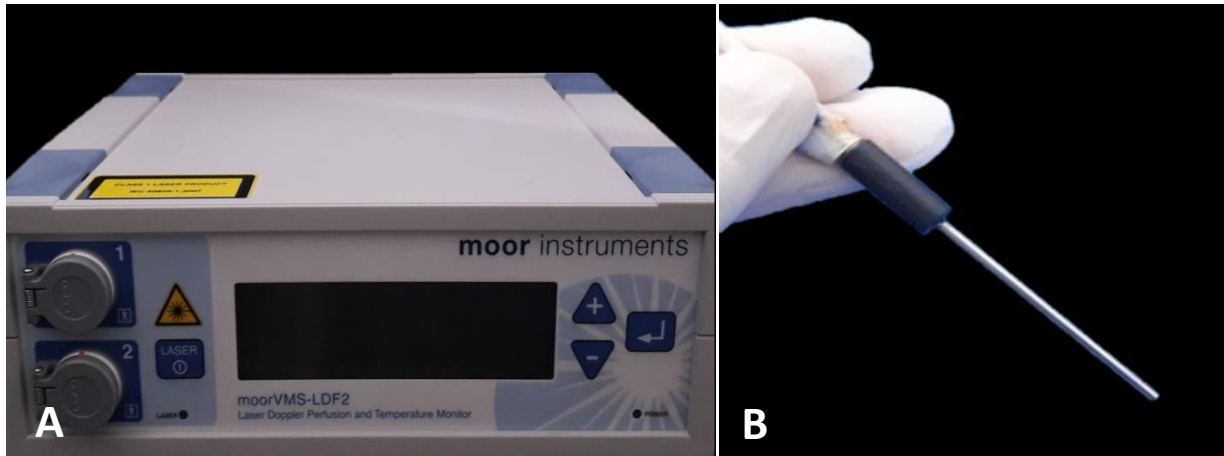
FONTE: O autor.

4.8 ANÁLISE DO FLUXO SANGUÍNEO LOCAL (LASER DOPPLER)

A avaliação do fluxo sanguíneo local foi realizada pelo Laser Doppler imediatamente anterior a eutanásia, em conjunto com a análise clínica. O equipamento utilizado foi o laser Doppler Blood Flow Monitor (Moor Instruments Ltd, UK) (FIGURA 8A). Após calibração da sonda PFS (Moor Instruments Ltd., UK) (FIGURA 8B), foi estipulada uma distância vertical de 1 mm da sonda a mucosa do animal, com auxílio de uma película radiográfica de mesma espessura. Os registros de fluxo foram padronizados na região central do alvéolo. Foram feitas três medidas distintas de 10 segundos em cada alvéolo, sendo obtida a mediana de cada região. Para manutenção da ponta laser, foi utilizado um aparato metálico para sua estabilização. Os registros foram armazenados em computador e analisados por meio de software fornecido pelo fabricante (Moor Soft for Windows/moorLDLS2). Os valores

de laser Doppler foram apresentados como alterações percentuais do fluxo sanguíneo.

FIGURA 8: A- Laser Doppler Blood Flow Monitor. B- Sonda PFS utilizada para análise.



FONTE: O autor.

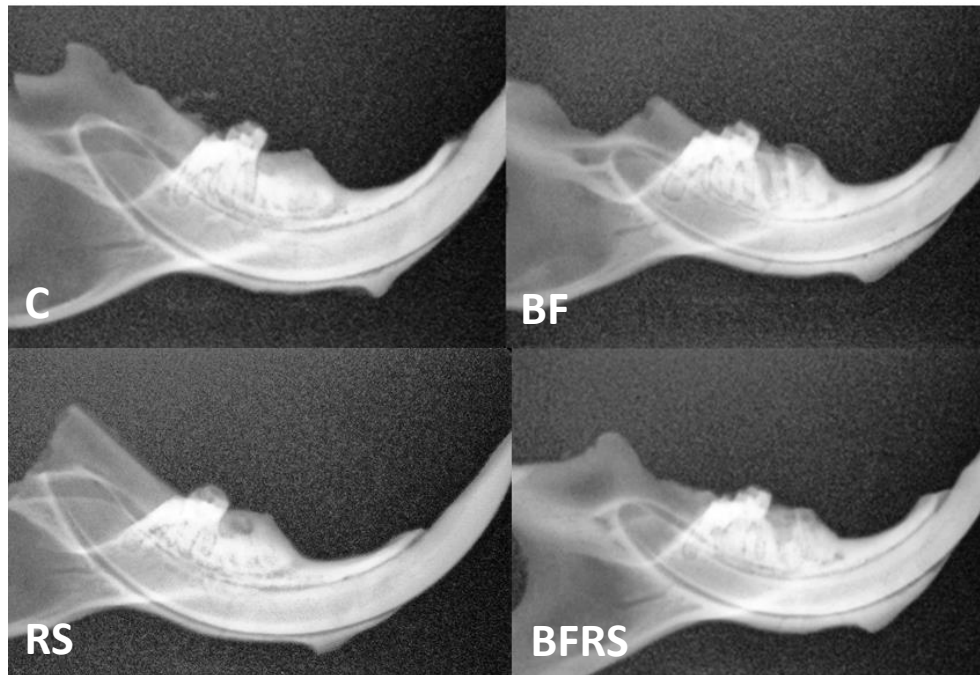
4.9 PREPARO DAS AMOSTRAS

Após avaliação clínica e de fluxometria sanguínea, os animais foram eutanasiados por sobredosagem anestésica. As hemimandíbulas esquerda foram dissecadas, removidos os tecidos moles e fixadas em formol a 10% durante 24 horas. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em álcool absoluto para desidratação a fim de realizar a análise radiográfica. Após a tomada de radiografias das hemimandíbulas, seguiram para descalcificação em ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) a 9% por 30 dias, sendo trocado diariamente e mantido sob constante agitação, para posterior histologia.

4.10 ANÁLISE RADIOGRÁFICA

Foram realizadas tomadas radiográficas das hemimandíbulas esquerda. Para isso, as peças foram posicionadas paralelamente ao sensor radiográfico digital com uma distância focal de 10 cm (Micro Imagem/FIT, Brasil). O tempo de exposição estabelecido pelo fabricante foi para dente posterior (0,50 s), sendo utilizado para todas as amostras. A partir das radiografias aumentadas em 100x, foi realizada a análise qualitativa, ou seja, presença/ausência de raiz residual e cicatrização gradual. Ainda foi observado sequestros ósseos, aspecto característico da ONM^{135,136} (FIGURA 9).

FIGURA 9: Radiografias da hemimandíbula esquerda.



FONTE: O autor.

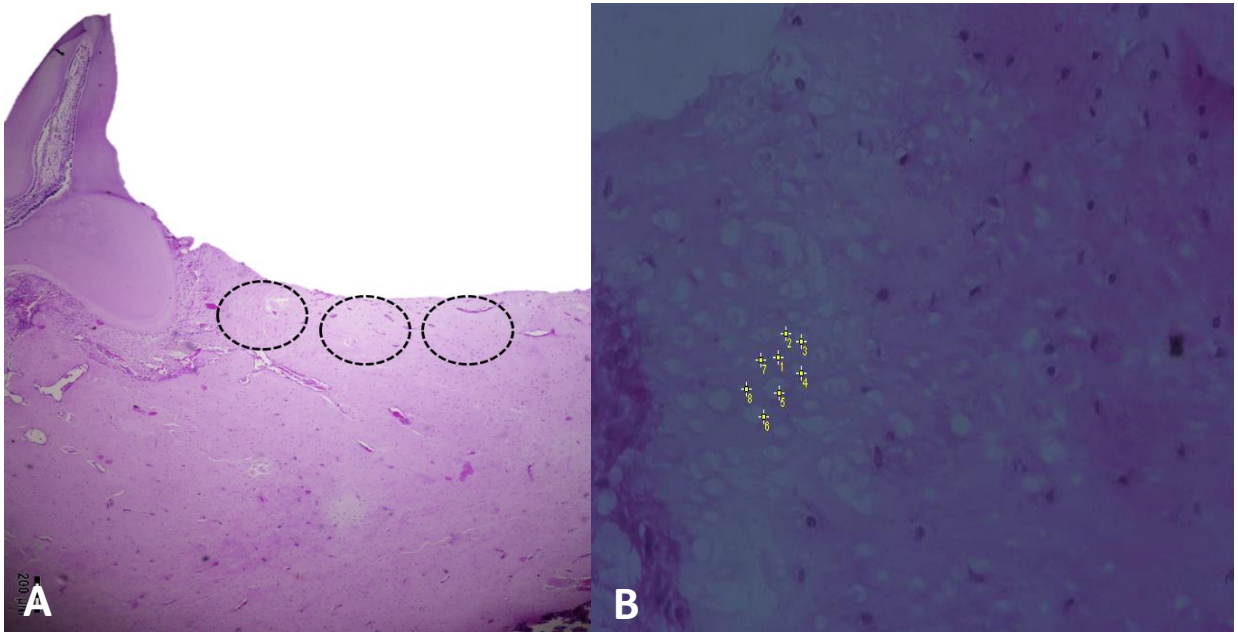
4.11 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após a desmineralização das hemimandíbulas, o material foi processado em um histotécnico de sistema semi-fechado (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL) onde passou pelas etapas de desidratação, diafanização e impregnação de parafina⁸.

Para a inclusão em parafina, as amostras foram posicionadas num plano coronal através do local da extração. Posteriormente, foram realizados cortes com 5 micrômetros, sendo obtida 3 lâminas com 3 cortes por animal. As lâminas obtidas foram coradas com Hematoxina e eosina (HE) utilizando um protocolo padrão. Três áreas foram fotografadas e analisadas com ampliação de 40x⁶⁶, possuindo como referência a raiz mesial do segundo molar (FIGURA 10A), em toda a extensão do alvéolo, utilizando microscópio binocular Olympus.

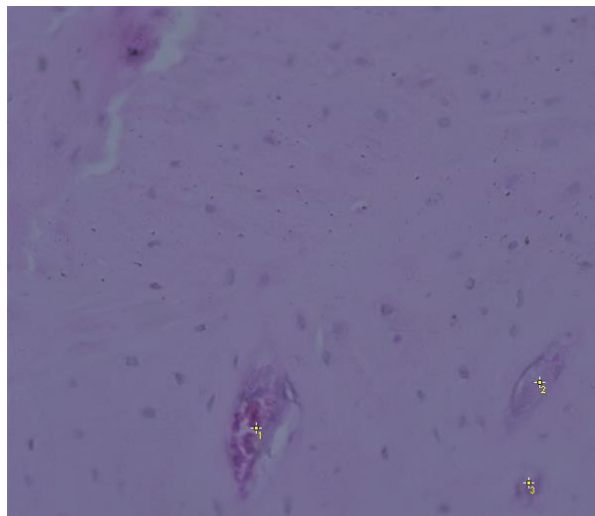
Com o auxílio do programa ImageJ, com a ferramenta de pontos múltiplos, foi realizada a análise qualitativa que abrange a presença/ausência de ONM (presença de necrose óssea - áreas vazias, sendo mais de 8 lacunas adjuntas sem osteócito considerada como osteonecrose)^{8,66} (FIGURA 10B). Ainda, foram quantificados vasos sanguíneos nas áreas analisadas e obtida a média para cada animal (FIGURA 11).

FIGURA 10: A- Área a ser analisada. FONTE: Mecca, 2018¹³¹. B- Área de osteonecrose observada em aumento de 40x (grupo BF).



FONTE: O autor

FIGURA 11: Contagem de vasos sanguíneos na área de reparo.



FONTE: O autor.

4.12 CLASSIFICAÇÃO DA SEVERIDADE DE ONM

Após confirmada a presença de ONM através da análise histológica, os animais foram alocados nos diferentes escores de acordo com sua severidade, segundo os parâmetros: histológico, imaginológico e clínico (FIGURA 12).

FIGURA 12: Severidade da osteonecrose de acordo com os escores I, II, III e IV.

Classificação da severidade da ONM a partir de parâmetros histológicos, imaginológicos e clínicos.			
Osteonecrose subclínica		Osteonecrose clínica	
I	II	III	IV
*Característica histológica : presença de 8 lacunas vazias adjuntas	* Característica histológica : presença de 8 lacunas vazias adjuntas. *Característica imaginológica : sequestros ósseos.	* Característica histológica : presença de 8 lacunas vazias adjuntas. * Característica imaginológica : sequestros ósseos. *Característica clínica : exposição óssea.	* Característica histológica : presença de 8 lacunas vazias adjuntas. * Característica imaginológica : sequestros ósseos *Característica clínica : exposição óssea + fístula extraoral.

FONTE: O autor.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

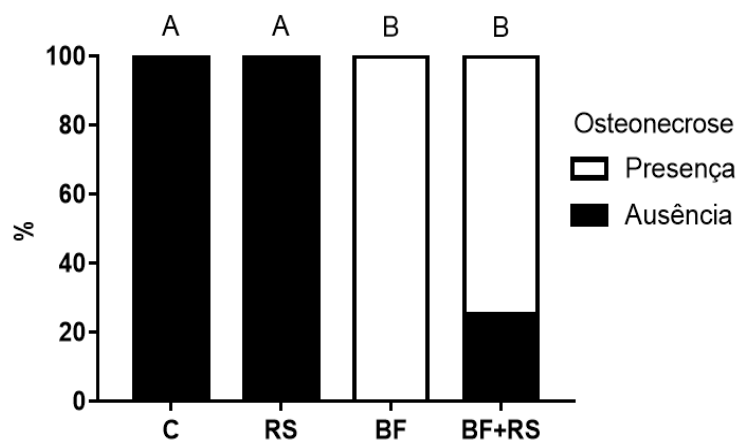
Para a análise dos dados quantitativos com distribuição normal, foi utilizado o teste de análise da variância (ANOVA) e pós teste de Tukey. Para avaliação de dados sem distribuição normal, foram eleitos o teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn's. Os dados qualitativos nominais dicotômicos foram analisados através do teste qui-quadrado com posterior teste exato de Fisher. O nível de significância de 0,05 ($p < 0,05$) foi adotado, para que as diferenças fossem consideradas significativas.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A partir da análise histológica, foi possível observar ausência ou presença de osteonecrose, sendo oito lacunas vazias adjuntas sem osteócitos considerada como área de necrose óssea^{8,66}. Não observou-se tecido necrótico nos grupos C e RS. O grupo BF apresenta necrose óssea em 100% (n=12) dos casos. Já no grupo BF+RS, a ONM histológica foi observada em 75% dos animais (n=9) (FIGURA 13).

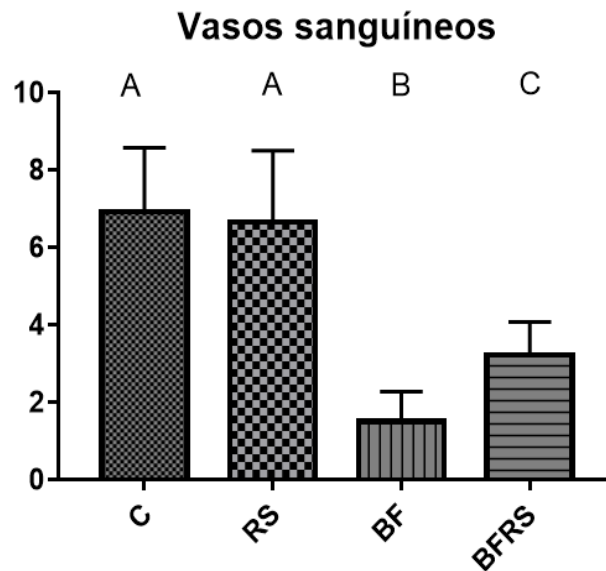
FIGURA 13: Representação gráfica da porcentagem de presença e ausência osteonecrose histológica. A ≠ B indica diferença estatística entre os grupos. Teste qui-quadrado, teste exato de Fischer (P<0,05).



FONTE: O autor.

Em relação aos vasos sanguíneos locais, observou-se aumento estatístico dessas estruturas no grupo BFRS comparado com o grupo BF. Já os grupos C e RS, mantiveram quantidades de vasos sanguíneos semelhantes, sem diferença estatística significativa, porém em maior quantidade estatística em comparação aos outros grupos (FIGURA 14).

FIGURA 14: Representação gráfica da quantidade de vasos sanguíneos na área de reparo. Análise da variância (ANOVA) e pós teste de Tukey ($P < 0,05$). $A \neq B \neq C$ indica diferença estatística entre os grupos.

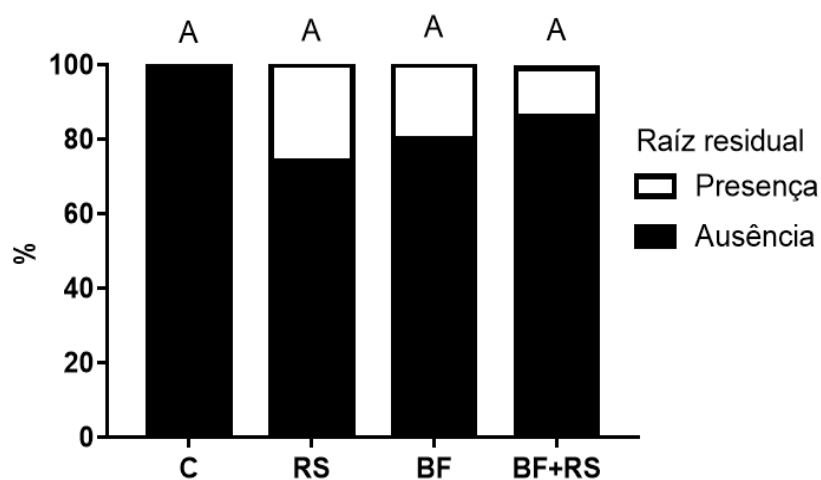


FONTE: O autor.

5.2 ANÁLISE RADIOGRÁFICA

A análise radiográfica possibilitou a visualização de raízes residuais. Observou-se a presença de remanescentes dentários devido à fratura trans-cirúrgica nos grupos RS, BF e BF+RS (FIGURA 15).

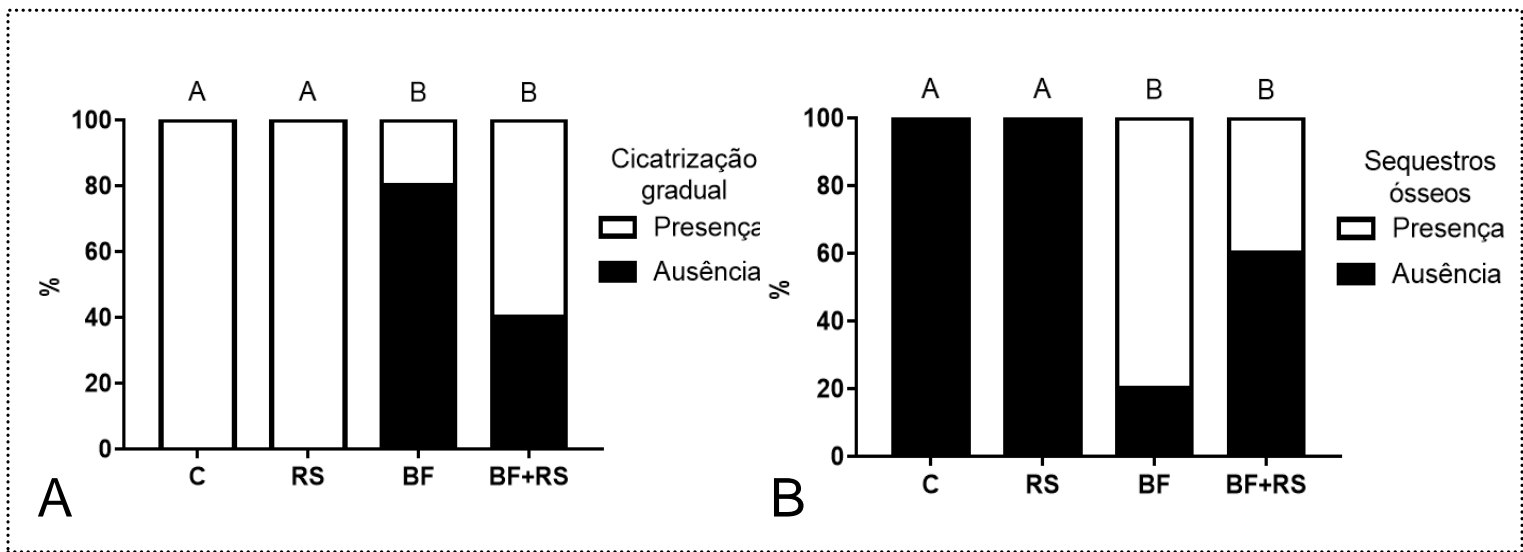
FIGURA 15: Representação gráfica da porcentagem de presença e ausência de raízes residuais observadas radiograficamente. (Teste qui-quadrado, teste exato de Fischer ($P < 0,05$)).



FONTE: O autor.

Ainda pode-se observar a presença/ausência de seqüestros ósseos e cicatrização gradual (CG). Nos grupos C e RS, em 100% dos casos, visualizou-se imagem compatível com processo de reparo normal (FIGURA 16A). Nota-se presença de seqüestros ósseos em 80% dos casos no grupo BF, enquanto o grupo BFRS foi de 40%, porém essa redução não foi estatisticamente significativa.

FIGURA 16: A- Representação gráfica da porcentagem de presença e ausência de cicatrização gradual observada radiograficamente. B- Representação gráfica da porcentagem de presença e ausência de seqüestros ósseos observados radiograficamente. A ≠ B indica diferença estatística entre os grupos (Teste qui-quadrado, teste exato de Fischer (P<0,05)).

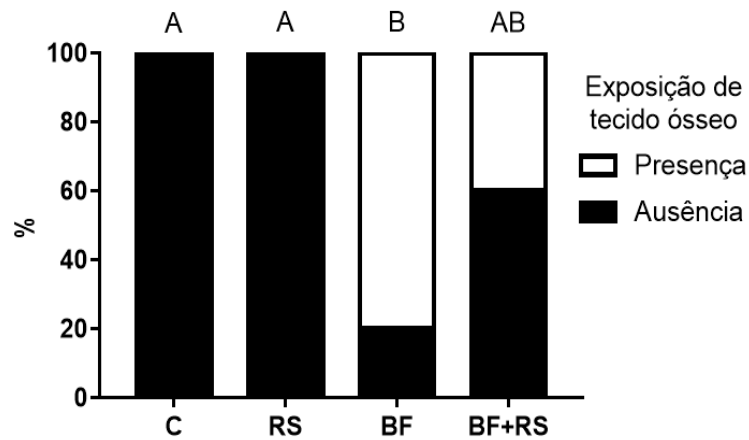


FONTE: O autor.

5.3 ANÁLISE CLÍNICA

Através da análise clínica realizada a partir de fotografia dos sítios cirúrgicos após 6 semanas, observou-se a presença ou ausência de exposição óssea. Os grupos C e RS apresentaram tecido cicatricial normal, com ausência de exposição óssea (100%). Já no grupo BF, observou-se atraso no reparo sendo 80% do n amostral que apresentou exposição óssea. No grupo BFRS houve uma diminuição para 40%, porém sem diferença estatística significativa (FIGURA 17).

FIGURA 17: Representação gráfica da porcentagem de presença e ausência de exposição de tecido ósseo macroscópico. A ≠ B indica diferença estatística entre os grupos (Teste qui-quadrado, teste exato de Fischer (P<0,05).

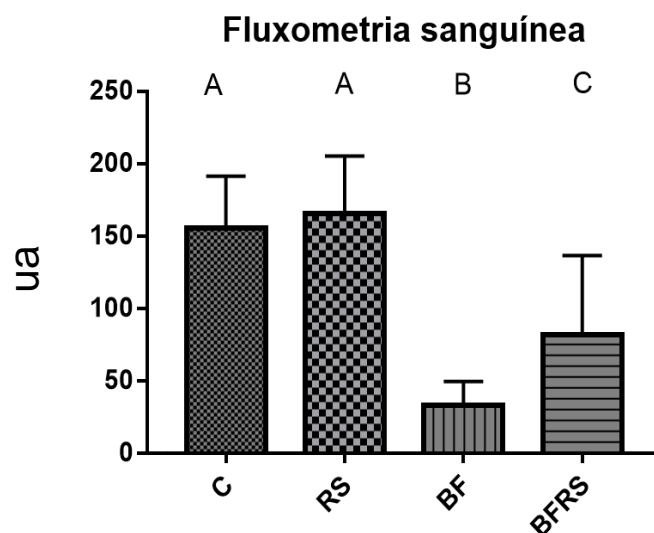


FONTE: O autor.

5.4 ANÁLISE FLUXOMETRIA SANGUÍNA

Através da avaliação do fluxo sanguíneo local por Laser Doppler, observou-se que os grupos C e RS obtiveram valores semelhantes, sem diferença estatística significativa. Já o grupo BF demonstrou menor fluxometria sanguínea em comparação com o BFRS e demais grupos (FIGURA 18).

FIGURA 18: Representação gráfica dos valores da fluxometria sanguínea avaliados por laser Doppler. Análise da variância (ANOVA) e pós teste de Tukey (P<0,05). A ≠ B ≠ C indica diferença estatística entre os grupos.

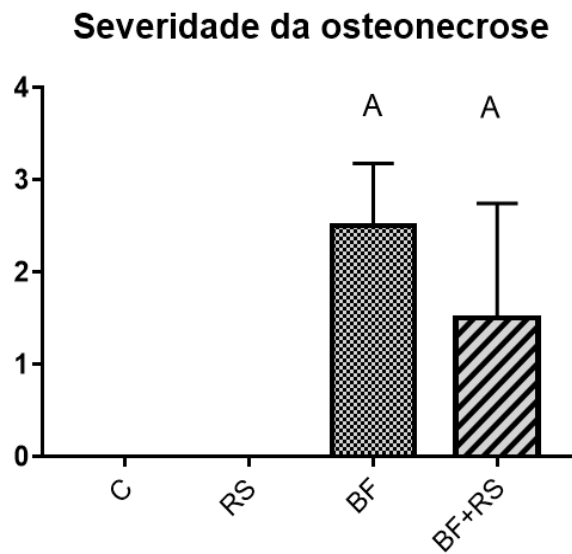


FONTE: O autor.

5.5 SEVERIDADE DA OSTEONECROSE

A partir da classificação, foi obtido o gráfico de escore de severidade. Os grupos C e RE não apresentam ON. Já o grupo BF apresentou predominância por maiores escores (3), no entanto, não se obteve diferença estatística com o grupo BFRS (FIGURA 19).

FIGURA 19: Escore de severidade de ONM. Teste de Kruskal wallis e pós teste de Dumm's.



FONTE: O autor.

6 DISCUSSÃO

Os Bifosfonatos possuem grande quantidade de indicações, por isso é provável que o cirurgião dentista se depare com pacientes que utilizam/utilizaram esse medicamento¹⁴⁰. Seu principal efeito adverso é a osteonecrose dos maxilares, uma condição desafiadora que não possui protocolo de tratamento completamente definido, o que justifica a realização desta pesquisa.

Neste trabalho, a indução da ONM foi baseada no estudo de Córdova et al. (2016) por sua equivalência em humanos. O protocolo terapêutico é semelhante à dose da droga utilizada no tratamento de mieloma múltiplo, de 4 anos de duração, em um adulto com 70 kg¹⁴³. Para o estabelecimento da ONM, foi realizada a exodontia, visto que esse efeito adverso geralmente se estabelece devido a fatores de risco na região bucomaxilofacial, sendo a extração dentária o fator odontológico mais relatado⁵⁴. Com o modelo de indução da osteonecrose fundamentado na literatura, optamos por esse procedimento cirúrgico⁴⁵.

Em uma revisão de Guyton em 2006, constatou-se efeitos relacionados a experiências com altas doses de estatina, como: lesão hepática, doenças renais e danos aos tecidos musculares¹⁴⁴. Entretanto, no presente estudo, a dose utilizada de Rosuvastatina foi de 3,2 mg/kg/dia por 8 semanas. Em um estudo onde foi administrado Rosuvastatina 20 mg/kg/dia por 14 dias, em ratos com periodontite induzida experimentalmente, não foram observadas complicações relacionadas com a droga¹⁴⁵.

Em relação à angiogênese e fluxometria sanguínea, os grupos C e RS apresentaram maiores valores, sem diferença estatística entre si. Já no grupo BFRS, observou-se maior quantidade de vasos sanguíneos e fluxometria sanguínea, comparado com o grupo BF. Kun et al. (2018) constatou que os BFs diminuem a vascularização, densidade dos microvasos, células endoteliais circulantes e angiogênese, devido ao menor VEGF¹⁵⁵. Em contrapartida, estudos mostram que a RS pode estimular as células progenitoras endoteliais e aumentar o VEGF^{114,115,116,117}. Estes fenômenos estão em concordância com os achados deste estudo. A deficiência de vascularização local compromete o tecido ósseo e contribui para o

desenvolvimento da osteonecrose. No entanto, Heras Rincon et al. (2007) não atribui esse evento sanguíneo a essa condição¹⁵⁶.

Na análise histológica da ONM, os grupos C e RS não apresentaram essa condição. Em contrapartida, foram observadas extensas áreas de lacunas vazias adjuntas (sem osteócitos) em 100% dos casos no grupo BF. Ainda que sob diferente protocolo terapêutico, achados semelhantes foram encontrados no estudo de Kolpakova e colaboradores em 2017¹⁴⁷. Nesse trabalho, foi observado necrose óssea histológica nos animais tratados com ácido zoledrônico e reparo ósseo normal no grupo controle. No grupo BFRS, a incidência da ONM foi reduzida, porém ainda observada na maioria dos animais (75%). A Rosuvastatina possui efeitos positivos no tecido ósseo^{89,90}, observado no aumento no preenchimento de defeitos ósseos da doença periodontal, melhora na regeneração de fraturas mandibulares e defeitos de calvária^{119,148,149}. No entanto, estes efeitos não foram suficientes para prevenir a osteonecrose. A administração concomitante de Rosuvastatina e ácido zoledrônico foi observada em um estudo de prevenção da resposta de fase aguda, onde apesar de sua resposta a inflamação, a RS em baixas doses não pode prevenir essa condição, demonstrando a alta potência dos BFs¹⁵². Além disso, a literatura demonstra a ação da Rosuvastatina na inibição da osteoclastogênese, podendo ser coadjuvante à diminuição da reabsorção óssea induzida pelos BFs, reduzindo ainda mais a renovação desse tecido^{91,153}.

No momento transcirúrgico da extração dentária, algumas raízes foram fraturadas e puderam ser visualizadas pela análise radiográfica, de forma semelhante em todos os grupos. Esta dificuldade foi também observada por Silva et al. (2015)¹⁴⁶, dessa forma, podemos avaliar o processo de reparo por meio do exame imaginológico, excluindo raízes residuais. Em relação ao reparo ósseo, os grupos C e RS apresentaram cicatrização gradual normal. No grupo BF foi observado o dobro de animais com sequestros ósseos (80%), em comparação com o grupo BFRS (40%). Essas alterações radiográficas são características do osso necrótico¹³⁵. Portanto, os resultados obtidos podem ser devido aos efeitos pleiotrópicos das estatinas. Chang et al. (2012) observou o aumento da osteogênese a partir da combinação de estatina com fator de crescimento, na osteonecrose induzida pelo calor. Estudos concluíram que as estatinas podem auxiliar na prevenção da osteonecrose avascular e a

relacionada à glicocorticoides, porém a etiopatogenia das osteonecroses são distintas^{150,151,154}.

Para análise da ONM clínica, observou-se cicatrização normal nos grupos C e RS. Com isso, observou-se que o grupo C e o RS mantiveram parâmetros semelhantes em todas as análises, demonstrando a segurança do fármaco em relação ao reparo ósseo após exodontias. Sezavar et al. (2018) observou aumento de osso em alvéolos dentários extraídos após preenchimento com estatinas e colágeno, porém sem diferença estatística¹⁴¹. Já o grupo BF apresentou-se com mais casos de exposição óssea (80%) comparado com o grupo BFRS (40%). Ruggiero et al. (2014) propõe que em menores estágios da osteonecrose, a exposição de osso necrótico pode não ser observada, apenas alterações radiográficas e sintomatologia inespecífica local⁷.

Como uma condição que afeta a qualidade de vida dos pacientes^{7,60}, Ruggiero et al. (2014) apresentou estágios e estratégias de tratamento para ONM em humanos. Devido a isso, nosso grupo de pesquisa propôs uma tabela de severidade desse efeito adverso, destinada aos animais, sendo que menores escores levam a abordagens mais conservadoras. Entretanto, apesar de escores mais baixos no grupo BFRS, não se obteve diferença estatística com o grupo BF, portanto, nessa dose e posologia, a Rosuvastatina não interferiu na severidade da ONM.

Dentro das limitações deste trabalho, foi alcançado o modelo de osteonecrose induzida por Bifosfonatos, assim como observado em Córdova et al.⁴⁵(2016). A terapêutica da ONM ainda não está consolidada, portanto a prevenção é fundamental para se evitar essa condição potencialmente debilitante. No entanto, apesar da redução da incidência e severidade da ONM, a Rosuvastatina não interferiu significativamente nessa condição. Apesar disso, foi observado no grupo BFRS o aumento de vasos e fluxometria sanguínea, comparados com o grupo BF, necessários para o reparo ósseo local e distribuição de drogas utilizadas na terapia da ONM. Novos estudos devem ser realizados para compreender a ação desse fármaco, em diferentes doses, no metabolismo do tecido ósseo e de vasos sanguíneos.

7 CONCLUSÃO

Dessa forma, os resultados demonstram que apesar da tendência a redução na incidência e severidade da osteonecrose da mandíbula induzida por Bifosfonatos, a Rosuvastatina não pode prevenir essa condição. No entanto, o grupo tratado com esse fármaco, apresentou efeitos benéficos ao tecido ósseo, por meio do aumento dos vasos e fluxometria sanguínea local.

REFERÊNCIAS

1. Farrier AJ, Sanchez Franco L, Shoaib A, Gulati V, Johnson N, Uzoigwe CE, Choudhury MZ. New anti-resorptives and antibody mediated anti-resorptive therapy. *The bone & Joint journal*. 2016;98(2):160-165.
2. da Costa Chaves RA, Órfão AMA, Júnior WB, Queiroz TP, & Faloni AP. Bifosfonatos e Denosumabes: mecanismos de ação e algumas implicações para a implantodontia. *Revista Brasileira Multidisciplinar*. 2018;21(2): 66-80.
3. Conry RM, Rodriguez MG, & Pressey JG. Zoledronic acid in metastatic osteosarcoma: encouraging progression free survival in four consecutive patients. *Clinical Sarcoma Research*. 2016;6(1):6.
4. Kim EH, Kim MS, Lee KH, Koh JS, Jung WG, & Kong CB. Zoledronic acid is an effective radiosensitizer in the treatment of osteosarcoma. *Oncotarget*.2016;7(43):70869.
5. Jiang P, Zhang P, Mukthavaram R, Nomura N, Pingle SC, Teng D, & Kesari S. Anti-cancer effects of nitrogen-containing bisphosphonates on human cancer cells. *Oncotarget*.2016;7(36):57932.
6. Tanaka Y, Iwasaki M, Murata-Hirai K, Matsumoto K, Hayashi K, Okamura H, & Toi M. Anti-tumor activity and immunotherapeutic potential of a bisphosphonate prodrug. *Scientific Reports*.2017;7(1):5987.
7. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw - 2014 update. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*.2014;72(10):1938–1956.
8. Howie RN, Borke JL, Kurago Z, Daoudi A, Cray J, Zakhary IE, & Medani FA model for osteonecrosis of the jaw with zoledronate treatment following repeated major trauma. *PloS one*.2015;10(7):132520.
9. Lee SH, Chang SS, Lee M, Chan RC, & Lee CC. Risk of osteonecrosis in patients taking bisphosphonates for prevention of osteoporosis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporosis International*. 2014.25(3),1131-1139.
10. Khan AA, Morrison A, Hanley DA, Felsenberg D, McCauley LK, O’Ryan F, & Watts NB. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2015;30(1):3-23.
11. Soares AL, Simon S, Gebrim LH, Nazário ACP, & Lazaretti-Castro M. Prevalence and risk factors of medication-related osteonecrosis of the jaw in osteoporotic and breast cancer patients: a cross-sectional study. *Supportive Care in Cancer*.2019;27(8):1-7.

12. Rasmusson L, & Abtahi J. Bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw: an update on pathophysiology, risk factors, and treatment. *International journal of Dentistry*.2014;2014(1)1-9.
13. Taylor T, Bryant C, & Popat S. A study of 225 patients on bisphosphonates presenting to the bisphosphonate clinic at King's College Hospital. *British Dental Journal*.2013;214(7):E18.
14. Barrett-Lee P, Casbard A, Abraham J, Hood K, Coleman R, Simmond P, & Murray N. Oral ibandronic acid versus intravenous zoledronic acid in treatment of bone metastases from breast cancer: a randomised, open label, non-inferiority phase 3 trial. *The Lancet Oncology*.2014;15(1):114-122.
15. Di Fede O, Panzarella V, Mauceri R, Fusco V, Bedogni A, Lo Muzio L & Campisi G. The dental management of patients at risk of medication-related osteonecrosis of the jaw: New paradigm of primary prevention. *BioMed Research International*.2018;2018(1)1-10.
16. Nomura T, Shibahara T, Uchiyama T, Yamamoto N, Shibui T, Yakushiji T, & Sekine R. Bisphosphonate-related osteonecrosis of jaw (BRONJ) in Japanese population: a case series of 13 patients at our clinic. *The Bulletin of Tokyo Dental College*.2013;54(2):117-125.
17. Ayukawa Y, Yasukawa E, Moriyama Y, Ogino Y, Wada H, Atsuta I, & Koyano K. Local application of statin promotes bone repair through the suppression of osteoclasts and the enhancement of osteoblasts at bone-healing sites in rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*.2009;107(3): 336-342.
18. Kinsella A, Raza A, Kennedy S, Fan Y, Wood AE, & Watson RW. The impact of high-dose statin therapy on transendothelial neutrophil migration and serum cholesterol levels in healthy male volunteers. *European Journal Of Clinical Pharmacology*.2011;67(11):1103.
19. Ishihara T, Miyazaki M, Notani N, Kanezaki S, Kawano M, & Tsumura H. Locally applied simvastatin promotes bone formation in a rat model of spinal fusion. *Journal of Orthopaedic Research*.2017;35(9):1942-1948.
20. Siddiqui AJ, Gustafsson T, Sylven C, & Crisby M. Rosuvastatin inhibits TIMP-2 and promotes myocardial angiogenesis. *Pharmacology*.2014; 93(3-4):178-184.
21. Khurana S, Gupta S, Bhalla H, Nandwani S, & Gupta V. Comparison of anti-inflammatory effect of atorvastatin with rosuvastatin in patients of acute coronary syndrome. *Journal Of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*. 2015; 6(3):130.
22. Kırzioğlu FY, Bulut MT, Doğan B, Fentoğlu Ö, Özmen Ö, Çarsancaklı AS & Orhan H. Anti-inflammatory effect of rosuvastatin decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis. *Journal Of Oral Science*.2017;59(2):247-255.

23. Caffrey AR, Timbrook TT, Noh E, Sakoulas G, Opal SM, Nizet V, & LaPlante, KL. Evidence to support continuation of statin therapy in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 2017;61(3):e02228-16.
24. Rodan GA, & Fleisch HA. Bisphosphonates: mechanisms of action. *The Journal Of Clinical Investigation*. 1996;97(12):2692-2696.
25. Gavaldá C, & Bagan JV. Concept, diagnosis and classification of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. A review of the literature. *Medicina Oral, Patologia Oral Y Cirugia Bucal*. 2016;21(3):e260.
26. Gutta R, & Louis PJ. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws: science and rationale. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2007;104(2):186-193.
27. Ruggiero SL. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: an overview. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1218(1):38-46.
28. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clinic Proceedings*. 2008;83:1032–45.
29. Stresing V, Fournier PG, Bellahcene A, Benzaid I, Monkkonen H, Colombel M. Nitrogen-containing bisphosphonates can inhibit angiogenesis in vivo without the involvement of farnesyl pyrophosphate synthase. *Bone*. 2011;48:259–66.
30. Lorenzo-Pouso AI, Pérez-Sayáns M, González-Palanca S, Chamorro-Petronacci C, Bagán J, & García-García A. Biomarkers to predict the onset of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: A systematic review. *Medicina Oral, Patologia Oral Y Cirugia Bucal*. 2019;24(1):e26.
31. Melton LJ, Khosla S, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Riggs BL. Relationship of bone turnover to bone density and fractures. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1997;12:1083–91
32. Holstein SA. A patent review of bisphosphonates in treating bone disease. *Expert Opinion On Therapeutic Patents*. 2019;29(5):315-325.
33. Wiemer AJ, Hohl RJ, Wiemer DF. The intermediate enzymes of isoprenoid metabolism as anticancer targets. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2009;9:526–542.
34. Sampaio FC, Pinho Veloso HH, & do Nascimento Barbosa D. Mecanismos de Ação Dos Bifosfonatos e sua Influência no Prognóstico do Tratamento Endodôntico. *Revista da Faculdade de Odontologia*. 2010;51(1):31-38.
35. Clarke BM, Boyette J, Vural E, Suen JY, Anaissie EJ, & Stack Jr BC. Bisphosphonates and jaw osteonecrosis: the UAMS experience. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2007;136(3):396-400.

36. Walter C, Grötz KA, Kunkel M, & Al-Nawas B. Prevalence of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw within the field of osteonecrosis. *Supportive Care in Cancer*.2007;15(2):197-202.
37. Junior F, Casado PL, & Barboza EDSP. Osteonecrose associada aos bifosfonatos na odontologia.*Periodontia*.2007;17(4):24-30.
38. Papapetrou PD. Bisphosphonate-associated adverse events.*Hormones*. 2009;8(2):96-110.
39. McClung M, Harris ST, Miller PD, Bauer DC, Davison KS, Dian L, & Lewiecki EM. Bisphosphonate therapy for osteoporosis: benefits, risks, and drug holiday. *The American Journal Of Medicine*.2013;126(1):13-20.
40. Howie RN, Borke JL, Kurago Z, Daoudi A, Cray J, Zakhary E., & Medani FA model for osteonecrosis of the jaw with zoledronate treatment following repeated major trauma. *PLoS one*.2015;10(7):e0132520.
41. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*.2003;6(9):1115-1117.
42. McClung MR, Lewiecki EM, Cohen SB, Bolognese MA, Woodson GC, Moffett AH. Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *The New England Journal of Medicine*.2006;354(1)821–31
43. Baron R, Ferrari S, & Russell RGG. Denosumab and bisphosphonates: different mechanisms of action and effects. *Bone*.2011;48(4):677-692.
44. Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, & Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*.2005;63(11):1567-1575.
45. Córdova LA, Guilbaud F, Amiaud J, Battaglia S, Charrier C, Lezot F, & Heymann D. Severe compromise of preosteoblasts in a surgical mouse model of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*.2016;44(9):1387-1394.
46. Boonyapakorn T, Schirmer I, Reichart PA, Sturm I, & Massenkeil G. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: prospective study of 80 patients with multiple myeloma and other malignancies.*Oral oncology*.2008;44(9):857-869.
47. Mawardi H, Giro G, Kajiya M, Ohta K, Almazrooa S, Alshwaimi E. A role of oral bacteria in bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *Journal of Dental Research*.2011;90(1)1339–45.

48. Maahs MP, Azambuja AA, Campos MM, Salum FG, & Cherubini K. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats. *Head & Neck*.2011;33(2):199-207.
49. Mozzati M, Arata V, & Gallesio G. Tooth extraction in osteoporotic patients taking oral bisphosphonates. *Osteoporosis International*.2013;24(5):1707-1712.
50. Chen YJ, Chao KS, Yang YC, Hsu ML, Lin CP, Chen YY. Zoledronic acid, an aminobisphosphonate, modulates differentiation and maturation of human dendritic cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*.2009;31(1):499–508.
51. Vincenzi B, Napolitano A, Zoccoli A, Iuliani M, Pantano F, Papapietro N, & Tonini G. Serum VEGF levels as predictive marker of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Journal Of Hematology & Oncology*.2012;5(1): 56.
52. Shibuya, M. Unique signal transduction of the VEGF family members VEGF-A and VEGF-E. *Biochemical Society Transactions*.2009;37(6):1161-1166.
53. Jayson GC, Kerbel R, Ellis LM, Harris AL. Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions. *The Lancet*.2016;388(10043):518–529. Review.
54. McGowan K, McGowan T, & Ivanovski, S. Risk factors for medication-related osteonecrosis of the jaws: A systematic review. *Oral diseases*.2018;24(4): 527-536.
55. Caminha RD, Chicrala GM, Júnior S, Valente LA, & Santos PSD. S. Risk profile for antiangiogenic agent-related osteonecrosis of the jaws. *Einstein*.2019; 17(3):eRW4628.
56. Dodson TB. The frequency of medication-related osteonecrosis of the jaw and its associated risk factors. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics*.2015;27(4): 509-516.
57. Allen MR, & Ruggiero SL. Higher bone matrix density exists in only a subset of patients with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*.2009;67(7):1373-1377.
58. Fedele S, Porter SR, D'Aiuto F, Aljohani S, Vescovi P, Manfredi M, & Lazarovici TS. Nonexposed variant of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a case series. *The American Journal Of Medicine*.2010;123(11):1060-1064.
59. Sharma D, Ivanovski S, Slevin M, Hamlet S, Pop TS, Brinzaniuc K, Miroiu RI. Bisphosphonate-related osteonecrosis of jaw (BRONJ): diagnostic criteria and possible pathogenic mechanisms of an unexpected anti-angiogenic side effect. *Vascular Cell*.2013;5(1):1.
60. Miksad RA, Lai KC, Dodson TB, Woo SB, Treister NS, Akinyemi O & Swan JS. Quality of life implications of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. *The Oncologist*. 2011;16(1):121-132.

61. Kishimoto H, Noguchi K, & Takaoka K. Novel insight into the management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Japanese Dental Science Review*.2019;55(1):95-102.
62. Morag Y, Morag-Hezroni M, Jamadar DA, Ward BB, Jacobson JA, Zwetchkenbaum SR, & Helman J. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a pictorial review. *Radiographics*.2009;29(7):1971-1984.
63. Suei Y. Radiographic findings of bisphosphonate-related osteomyelitis of the jaw: investigation of the diagnostic points by comparison with radiation osteomyelitis, suppurative osteomyelitis, and diffuse sclerosing osteomyelitis. *Oral Radiology*.2013;29(1):121–34.
64. Taguchi A, Akiyama H, Koseki T, Shimizutani K. Recognition of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw among oral and maxillofacial radiologists: results from a questionnaire-based survey in Japan. *Oral Radiology*.2013;29(1):98–104.
65. Bedogni A, Blandamura S, Lokmic Z, Palumbo C, Ragazzo M, Ferrari F, & Ferretti, M. Bisphosphonate-associated jawbone osteonecrosis: a correlation between imaging techniques and histopathology. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*.2008;105(3):358-364.
66. Pacheco VN, Langie R, Etges A, Ponzoni D, & Puricelli E. Nitrogen-containing bisphosphonate therapy: assessment of the alveolar bone structure in rats—a blind randomized controlled trial. *International Journal Of Experimental Pathology*.2015;96(4):255-260.
67. Barba-Recreo P, García-Arranz M, Yébenes L, & Burgueño M. Zoledronic acid-related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*.2014;42(6):744-750.
68. Hinson AM, Smith CW, Siegel ER, & Stack BC. Is bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw an infection? A histological and microbiological ten-year summary. *International Journal of Dentistry*. 2014:2014(1):1-7.
69. Hutchinson M, O’Ryan F, Chavez V, Lathon PV, Sanchez G, Hatcher DC, & Lo JC. Radiographic findings in bisphosphonate-treated patients with stage 0 disease in the absence of bone exposure. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*.2010;68(9): 2232-2240.
70. Fortuna G, Ruoppo E, Pollio A, Aria M, Adamo D, Leuci S, & Mignogna MD. Multiple myeloma vs. breast cancer patients with bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaws: a comparative analysis of response to treatment and predictors of outcome. *Journal of Oral Pathology & Medicine*.2012;41(3):222-228.
71. Yarom N, Shapiro CL, Peterson DE, Van Poznak CH, Bohlke K, Ruggiero S. L, & Murphy, B. A. Medication-related osteonecrosis of the jaw: MASCC/ISOO/ASCO Clinical Practice Guideline. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(25): 2270-2290.

72. Bashutski JD, Eber RM, Kinney JS, Benavides E, Maitra S, Braun TM, McCauley LK. Teriparatide and osseous regeneration in the oral cavity. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(25):2396-2405.
73. Epstein MS, Wicknick FW, Epstein JB, Berenson JR, Gorsky M. Management of bisphosphonate-associated osteonecrosis: pentoxifylline and tocopherol in addition to antimicrobial therapy. An initial case series *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology and Endodontology*. 2010;110:593–6. 260.
74. Vescovi P, Manfredi M, Merigo E, Meleti M, Fornaini C, Rocca JP, & Nammour S. Surgical approach with Er: YAG laser on osteonecrosis of the jaws (ONJ) in patients under bisphosphonate therapy (BPT). *Lasers In Medical Science*. 2010;25(1):101.
75. Ripamonti CI, Cislighi E, Mariani L, Maniezzo M. Efficacy and safety of medical ozone (O₃) delivered in oil suspension applications for the treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with bone metastases treated with bisphosphonates: preliminary results of a phase I-II study. *Oral Oncology*. 2011;47:185–90. 258.
76. Cella L, Oppici A, Arbasì M, Moretto M, Piepoli M, Vallisa D, & Cavanna L. Autologous bone marrow stem cell intralesional transplantation repairing bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw. *Head & Face Medicine*. 2011;7(1):16.
77. Ziebart T, & Walter C. Response to Comments on “Geranylgeraniol—A new potential therapeutic approach to bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw”. *Oral Oncology*. 2011;5(47):438.
78. Freiburger JJ, Padilla-Burgos R, McGraw T, Suliman HB, Kraft KH, Stolp B. W, Piantadosi CA. What is the role of hyperbaric oxygen in the management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a randomized controlled trial of hyperbaric oxygen as an adjunct to surgery and antibiotics. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2012;70(7):1573-1583.
79. Chang PC, Lim LP, Chong LY, Dovban ASM, Chien LY, Chung MC, Kuo YP. PDGF-simvastatin delivery stimulates osteogenesis in heat-induced osteonecrosis. *Journal Of Dental Research*. 2012;91(6):618-624.
80. Yang Z, Liu H, Li D, Xie X, Qin T, Ma J, & Kang P. The efficacy of statins in preventing glucocorticoid-related osteonecrosis in animal models: a meta-analysis. *Bone & Joint Research*. 2016;5(9):393-402.
81. Oesterle A, Laufs U, & Liao JK. Pleiotropic effects of statins on the cardiovascular system. *Circulation Research*. 2017;120(1):229-243.
82. Mortensen MB, & Nordestgaard BG. Statin Use in Primary Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Disease According to 5 Major Guidelines for Sensitivity, Specificity, and Number Needed to Treat. *JAMA cardiology*. 2019;4(11):1131-1138.

83. Sirtori CR. The pharmacology of statins. *Pharmacological Research*.2014; 88(1)3–11.
84. Endo AA. Historical perspective on the discovery of statins. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*.2010;86(5):484-493.
85. Zhou Q; Liao J. Pleiotropic effects of statins -Basis cresearch and clinical perspectives, *Circulation Journal*. 2010;74(5): 818-826.16.
86. Zhou Q, Liao J. Statins and cardiovascular diseases: from cholesterol lowering to pleiotropy, *Current Pharmaceutical Design*.2009;15(5):467-478.17.
87. S Antonopoulos A, Margaritis M, Lee R, Channon K, & Antoniades C. Statins as anti-inflammatory agents in atherogenesis: molecular mechanisms and lessons from the recent clinical trials.*Current Pharmaceutical Design*. 2012;18(11):1519-1530.
88. Wong RWK, Rabie ABM. Statin collagen grafts used to repair defects in the parietal bone of rabbits. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2003;41(4):244-248.
89. Ayukawa Y, Yasukawa E, Moriyama Y, Ogino, Y, Wada H, Atsuta I, & Koyano, K. Local application of statin promotes bone repair through the suppression of osteoclasts and the enhancement of osteoblasts at bone-healing sites in rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*.2009;107(3): 336-342.
90. Tong H, Holstein SA, & Hohl RJ. Simultaneous determination of farnesyl and geranylgeranyl pyrophosphate levels in cultured cells. *Analytical Biochemistry*. 2005;336(1):51-59.
91. Ruan F, Zheng Q, & Wang J. Mechanisms of bone anabolism regulated by statins. *Bioscience Reports*.2012;32(6):511-519.
92. Nozaki Y, Kumagai K, Miyata N, & Niwa M. Pravastatin reduces steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in SHRSP rats. *Acta Orthopaedica*. 2012;83(1): 87-92.
93. Agidigbi TS, Kim C. Reactive Oxygen Species in Osteoclast Differentiation and Possible Pharmaceutical Targets of ROS-Mediated Osteoclast Diseases. *International Journal Of Molecular Sciences*.2019;20(14):3576.
94. Horn MP, Knecht SM, Rushing FL, Birdsong J, Siddall CP, Johnson CM, Bishop DL. Simvastatin inhibits *Staphylococcus aureus* host cell invasion through modulation of isoprenoid intermediates. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.2008;326(1):135-143.
95. Graziano TS, Cuzzullin MC, Franco GC., Schwartz-Filho HO, de Andrade ED, Groppo FC & Cogo-Müller K . Statins and antimicrobial effects: simvastatin as a

- potential drug against *Staphylococcus aureus* biofilm. *PloS one*. 2015;10(5):e0128098.
96. Chow OA, von Köckritz-Blickwede M, Bright AT, Hensler ME, Zinkernagel AS, Cogen AL, Nizet V. Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps. *Cell host & microbe*.2010;8(5):445-454.
 97. Emani S, Gunjiganur GV & Mehta DS. Determination of the antibacterial activity of simvastatin against periodontal pathogens, *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: An in vitro study. *Contemporary Clinical Dentistry*.2014;5(3):377.
 98. Ting M, Whitaker EJ, & Albandar JM. Systematic review of the in vitro effects of statins on oral and perioral microorganisms. *European Journal Of Oral Sciences*.2016;124(1):4-10.
 99. Benes LB, Bassi NS, & Davidson MH. The risk of hepatotoxicity, new onset diabetes and rhabdomyolysis in the era of high-intensity statin therapy: does statin type matter?. *Progress In Cardiovascular Diseases*.2016;59(2):145-152.
 100. Bellosta S & Corsini A. Statin drug interactions and related adverse reactions. *Expert Opinion On Drug Safety*.2012;11(6):933-946.
 101. Cortese F, Gesualdo M, Cortese A, Carbonara S, Devito F, Zito A, Ciccone MM. Rosuvastatin: Beyond the cholesterol-lowering effect. *Pharmacological Research*.2016;(107):1-18.
 102. Karlson BW, Palmer MK, Nicholls SJ, Lundman P, & Barter PJ. To what extent do high-intensity statins reduce low-density lipoprotein cholesterol in each of the four statin benefit groups identified by the 2013 American College of Cardiology/American Heart Association guidelines? A VOYAGER meta-analysis. *Atherosclerosis*.2015;241(2):450-454.
 103. Rosenson RS. Rosuvastatin: a new inhibitor of HMG-coA reductase for the treatment of dyslipidemia. *Expert Review Of Cardiovascular Therapy*.2003; 1(4):495-505.
 104. Olsson AG, McTaggart F, & Raza. Rosuvastatin: a highly effective new HMG-CoA reductase inhibitor. *Cardiovascular Drug Reviews*.2002;20(4):303-328.
 105. White CM. A review of the pharmacologic and pharmacokinetic aspects of rosuvastatin. *The Journal of Clinical Pharmacology*.2002;42(9):963-970.
 106. Long SB, Blaha MJ, Blumenthal RS, & Michos ED. Clinical utility of rosuvastatin and other statins for cardiovascular risk reduction among the elderly. *Clinical Interventions In Aging*.2011;6(1):27.
 107. McTaggart F. Comparative pharmacology of rosuvastatin. *Atherosclerosis Supplements*.2003;4(1): 9-14.

108. Garg S, & Pradeep AR. 1.2% rosuvastatin and 1.2% atorvastatin gel local drug delivery and redelivery in the treatment of class II furcation defects: a randomized controlled clinical trial. *Journal of Periodontology*.2017;88(3):259-265.
109. Khurana S, Gupta S, Bhalla H, Nandwani S, Gupta V. Comparison of anti-inflammatory effect of atorvastatin with rosuvastatin in patients of acute coronary syndrome. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*. 2015;6:130-135.
110. Ma Q, Zhou Y, Zhai G, Gao F, Zhang L, Wang J, Cheng W. Meta-analysis comparing rosuvastatin and atorvastatin in reducing concentration of C-reactive protein in patients with hyperlipidemia. *Angiology*. 2016;67(6):526-535.
111. Stalker TJ, Lefer AM, & Scalia R. A new HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, exerts anti-inflammatory effects on the microvascular endothelium: the role of mevalonic acid. *British Journal of Pharmacology*. 2001;133(3):406-412.
112. Sánchez-Aguilar M, Tapia-Pérez JH, Sánchez-Rodríguez JJ, Viñas-Ríos JM, Martínez-Pérez P, De La Cruz-Mendoza E, Gordillo-Moscoso A. Effect of rosuvastatin on cytokines after traumatic head injury. *Journal of Neurosurgery*. 2013;118(3):669-675.
113. Qian C, Wei B, Ding J, Wu H, Cai X, Li B, Wang Y. Meta-analysis comparing the effects of rosuvastatin versus atorvastatin on regression of coronary atherosclerotic plaques. *Am. Journal of Cardiology*.2015;116:1521–1526.
114. Zhou J, Cheng M, Liao YH, Hu Wu M, Wang Q, Goukassian D. Rosuvastatin enhances angiogenesis via eNOS-dependent mobilization of endothelial progenitor cells. *Plos one*.2013;8(5): e63126.
115. Chiang KH, Cheng WL, Shih CM, Lin YW, Tsao NW, Kao YT, Lin FY. Statins, HMG-CoA reductase inhibitors, improve neovascularization by increasing the expression density of CXCR4 in endothelial progenitor cells. *PloS one*.2015;10(8):e0136405.
116. Zhang Y, Yuan H, Sun Y, Wang Y, & Wang A. The effects of ethanol on angiogenesis after myocardial infarction, and preservation of angiogenesis with rosuvastatin after heavy drinking. *Alcohol*.2016;54:27-32.
117. Erbs S, Beck EB, Linke A, Adams V, Gielen S, Kränkel N, Schuler G. High-dose rosuvastatin in chronic heart failure promotes vasculogenesis, corrects endothelial function, and improves cardiac remodeling—results from a randomized, double-blind, and placebo-controlled study.*International Journal of Cardiology*.2011;146(1):56-63.
118. Zaitone SA, & Abo-Gresha NM. Rosuvastatin promotes angiogenesis and reverses isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats: role of iNOS and VEGF. *European Journal of Pharmacology*.2012;691(1-3):134-142.

119. Tüerer A, Tüerer ÇC, Durmuşlar MC, Ballı U, & Önger ME. The influence of oral administration of rosuvastatin on calvarial bone healing in rats. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*.2016;44(9):1327-1332.
120. Chatterjee D, Kapoor A, Vijay S, Sobti G, Kara D, & Thanvi J. Efficacy of Locally Administered 1.2% Rosuvastatin Gel in Patients with Periodontitis: A Randomized Placebo Controlled Clinical Trial. *European Journal of Dentistry*. 2019;13(1):29–35.
121. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamauchi M, Sugimoto T. Rosuvastatin increased serum osteocalcin levels independent of its serum cholesterol-lowering effect in patients with type 2 diabetes and hypercholesterolemia. *Internal Medicine*.2009;48(21):1869-1873.
122. Monjo M, Rubert M, Ellingsen JE, & Lyngstadaas SP. Rosuvastatin promotes osteoblast differentiation and regulates SLCO1A1 transporter gene expression in MC3T3-E1 cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*.2010; 26(4-5):647-656.
123. Lazzerini PE, Capperucci C, Spreafico A, Capecchi PL, Niccolini S, Ferrata P & Laghi-Pasini F. Rosuvastatin inhibits spontaneous and IL-1 β -induced interleukin-6 production from human cultured osteoblastic cells. *Joint Bone Spine*.2013;80(2):195-200.
124. Labranche N, Youl EN, El Khattabi C, Dewachter L, Wauthoz N, Delporte C, Pochet S. Rosuvastatin and vascular oxidative stress induced by diesel exhaust particles. *Acta cardiologica*.2016;71(5):565-572.
125. Kilit C, Koçak FE, & Paşalı Kilit T. Comparison of the effects of high-dose atorvastatin and high-dose rosuvastatin on oxidative stress in patients with acute myocardial infarction: A pilot study. *Archives of the Turkish Society of Cardiology*.2017;45(3):235-243.
126. Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, & Al-Buhadily AK. Rosuvastatin as forthcoming antibiotic or as adjuvant additive agent: In vitro novel antibacterial study. *Journal Of Laboratory Physicians*.2018;10(3):271.
127. Ko HH, Lareu RR, Dix BR, & Hughes JD. Statins: antimicrobial resistance breakers or makers?.*PeerJ*.2017;(5):e3952.
128. Zipes DP, Zvaifler NJ, Glasscock RJ, Gilman S, Muñoz A, Gogolak V, & Witztum JL. Rosuvastatin: an independent analysis of risks and benefits. *Medscape General Medicine* 2006;8(2):73.
129. Yanık S, Aras MH, Erkılıç S, Bozdağ Z, Demir T, & Cetiner S. Histopathological features of bisphosphonates related osteonecrosis of the jaw in rats with and without vitamin d supplementation. *Archives of Oral Biology*. 2016;65(1):59-65.
130. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Eficácia e Segurança do uso dos Bisfosfonato por longo prazo para prevenção de fraturas osteoporóticas em mulheres na menopausa. *Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde*. Ano VII, nº21. 2013.

131. Mecca LEA. Avaliação do Ranelato de Estrôncio na indução ou proteção de osteonecrose, estudo em ratas ovariectomizadas. 2018. Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa.
132. Spiel AO, Mayr FB, Leitner JM, Firbas C, Sieghart W, & Jilka B. Simvastatin and rosuvastatin mobilize Endothelial Progenitor Cells but do not prevent their acute decrease during systemic inflammation. *Thrombosis Research*.2008;123(1):108-113.
133. Reagan-Shaw S, Nihal M, & Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB journal*.2008;22(3):659-661.
134. Lopes de Souza G, Araújo AA, da Silva GR, Silva LMP, dos Santos Lima FM, & da Mata N. Alterações bioquímicas em ratos com doença periodontal e tratados com olmesartana, captopril e atorvastatina. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*.2013;12(1):50-54.
135. Jabbour Z, El-Hakim M, Henderson JE, & Rubens F. Bisphosphonates inhibit bone remodeling in the jaw bones of rats and delay healing following tooth extractions. *Oral oncology*.2014;50(5):485-490.
136. de Barros Silva PG, Junior AECF, Teofilo CR, Barbosa MC, Júnior R. CPL, Sousa FB, & Alves APNN. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. *Archives Of Oral Biology*.2015;60(9):1237-1245.
137. Yanik S, Aras MH, Erkılıç S, Bozdağ Z, Demir T, & Cetiner S. Histopathological features of bisphosphonates related osteonecrosis of the jaw in rats with and without vitamin d supplementation. *Archives Of Oral Biology*. 2016;65(1):59-65.
138. Imada TSN. O efeito do ácido zoledrônico na microestrutura óssea analisado pela micro-CT em mandíbulas de ratos wistar. 2015. Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade de São Paulo.
139. Ministério da saúde. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais. Brasília, 2012.
140. Zak M, Spina AM, Spinazze RP, Perkinson WL, Spinazze DJ. Bisphosphonates and the dental patient: Part 2. *The Compendium of Continuing Education*. 2007;28(9):510-5.
141. Sezavar M, Bohlouli B, Farhadi S, Tabatabaee S, & Latifi R. Simvastatin effects on dental socket quality: a comparative study. *Contemporary clinical dentistry*. 2018;9(1): 55.
142. Schanaider A, Silva PC. Uso de animais em cirurgia experimental. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2004;19(4):441-7, 2004.

143. Pozzi S et al. High-dose zoledronic acid impacts bone remodeling with effects on osteoblastic lineage and bone mechanical properties. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(18):5829-39.
144. Guyton JR. Benefit versus risk in statin treatment. *The American Journal of Cardiology*. 2006;97(8):S95-S97.
145. Kirzioğlu FY, Bulut MT, Doğan B, Fentoğlu Ö, Özmen Ö, Çarsancaklı AS & Orhan H. Anti-inflammatory effect of rosuvastatin decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis. *Journal Of Oral Science*. 2017;59(2):247-255.
146. Silva PGB et al. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. *Archives of Oral Biology*. 2015;60(9):1237-1245.
147. Kolpakova ME, Zubareva AA, Artamonova TD, Lisovskaya EK., Chefu SG, Yagmurov OD, & Vlasov TD. Experimental model of osteonecrosis of the jaw in rats treated with zoledronic acid. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2017;55(2):156-159.
148. Chatterjee D, Kapoor A, Vijay S, Sobti G, Kara D, & Thanvi J. Efficacy of Locally Administered 1.2% Rosuvastatin Gel in Patients with Periodontitis: A Randomized Placebo Controlled Clinical Trial. *European Journal of Dentistry*. 2019;13(1):29–35.
149. Türer A, Durmuslar MC, Sener I, Misir AF, & Önger ME. The Effect of Local Rosuvastatin on Mandibular Fracture Healing. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2016;27(8):e758-e761.
150. Chang PC, Lim LP, Chong LY, Dovban, ASM, Chien LY, Chung MC, & Kuo YP. PDGF-simvastatin delivery stimulates osteogenesis in heat-induced osteonecrosis. *Journal of Dental Research*. 2012;91(6):618-624.
151. Yang Z, Liu H, Li D, Xie X, Qin T, Ma J, & Kang P. The efficacy of statins in preventing glucocorticoid-related osteonecrosis in animal models: a meta-analysis. *Bone & Joint Research*. 2016;5(9),393-402.
152. Makras P, Anastasilakis AD, Polyzos SA, Bisbinas I, Sakellariou GT, & Papapoulos SE. No effect of rosuvastatin in the zoledronate-induced acute-phase response. *Calcified Tissue International*. 2011;88(5):402-408.
153. Mohamed MT, Abuelezz SA, Atalla SS, El Aziz LFA, & Gorge SS. The anti-osteoporotic and anti-atherogenic effects of alendronate and simvastatin in ovariectomized rats fed high fat diet: a comparative study of combination therapy versus monotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;89(1):1115-1124.
154. Yin H, Yuan Z, & Wang D. Multiple drilling combined with simvastatin versus multiple drilling alone for the treatment of avascular osteonecrosis of the femoral head: 3-year follow-up study. *BMC musculoskeletal disorders*. 2016;17(1):344.

155. Kün-darbois JD et al. Bone mineralization and vascularization in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: an experimental study in the rat. *Clinical Oral Investigations*. 2018;22(2):1-10.
156. Heras Rincón I, Zubillaga Rodríguez I, Castrillo Tambay M, & Montalvo Moreno JJ. Osteonecrosis of the jaws and bisphosphonates: Report of fifteen cases. Therapeutic recommendations. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*, 2007;12(4):267-271.
157. Ruggiero SL; Fantasia J, Carlson E. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, And Endodontology*. 2006; 102(4):433-441, out.
158. Scarpa LC, de Mello Leite LC, de Lacerda JCT, & Arantes, DCB. Osteonecrose nos ossos da maxila e mandíbula associada ao uso do bifosfonato de sódio. *Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde/Brazilian Journal of Health Research*. 2010; 12(1):86-92
159. Fernandes CP, et al. Leukocytosis Induced by Zoledronic Acid: A Possible Cofactor for the Development of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* 2015;120(2):e99.

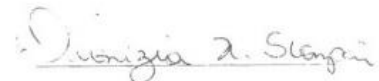
ANEXO A- Comitê de Ética de Experimentação Animal (031/2018)**UEPG**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA-GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL****CARTA DE APROVAÇÃO****Processo/ Process CEUA – 031/2018**
Protocolo UEPG – 11062/2018**Título – . Solicita 48 ratos machos wistar com 90 dias para o projeto de pesquisa
“O efeito preventivo da rosuvastatina na osteonecrose dos maxilares induzida por
bifosfonatos”.****Interessada: Gilson César Nobre Franco****e-mail: gilsoncnf@gmail.com**
Data de Entrada – 24/07/2018
Resultado: Aprovado**Considerações**

A comissão de Ética no Uso de animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CEUA-UEPG) certifica que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa acima especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA), estabelecidas pelo Conselho Nacional para fins de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal. Dessa forma, fica autorizada a utilização de 48 ratos machos de 90 dias para a execução desse projeto.

Ponta Grossa, 28 de agosto de 2018

Prof. Dra. Dionizia Xavier Scoparini
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG