



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Riéli Elis Schulz

O papel da Esclerostina nas necroses ósseas dos maxilares: Avaliação dos níveis séricos e da relação com parâmetros clínicos, bioquímicos e imaginológicos

Florianópolis
2023

Riéli Elis Schulz

O papel da Esclerostina nas necroses ósseas dos maxilares: Avaliação dos níveis séricos e da relação com parâmetros clínicos, bioquímicos e imaginológicos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Odontologia, área de Diagnóstico Bucal.

Orientador: Prof. Gustavo Davi Rabelo, Dr.

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Schulz, Riéli Elis

O papel da Esclerostina nas necroses ósseas dos
maxilares : Avaliação dos níveis séricos e da relação com
parâmetros clínicos, bioquímicos e imaginológicos / Riéli Elis
Schulz, ; orientador, Gustavo Davi Rabelo, 2023.

75 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Osteonecrose. 3. Fractais. 4. SOST
proteína humana. 5. Estomatologia. I. , . II. Rabelo,
Gustavo Davi. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

Riéli Elis Schulz

O papel da Esclerostina nas necroses ósseas dos maxilares: Avaliação dos níveis séricos e da relação com parâmetros clínicos, bioquímicos e imaginológicos

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 14 de julho de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Elena Riet Correa Rivero, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Rogério de Oliveira Gondak, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Alessandra Rodrigues de Camargo, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de Diagnóstico Bucal.



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Prof. Gustavo Davi Rabelo, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2023

AGRADECIMENTOS

Existe uma odontologia muito diferente dos sorrisos perfeitos. **É a odontologia das dores.** Do sofrimento, definhamento, do diagnóstico triste, dos maus odores, dos ossos necróticos, infectados, com os maxilares e dentes “arrancados” e deformados, e dos pacientes que não conseguem comer e falar com dignidade. Essa odontologia traz conforto, cura, alivia as dores físicas e emocionais e arranca sorrisos imperfeitos. É a odontologia da diferença que fizemos na vida de nossos pacientes. O agradecimento principal vai aos **pacientes**, com quem tive a oportunidade de conviver, atender e ajudar, durante toda minha trajetória acadêmica e profissional. Estas pessoas me deram a oportunidade de exercer essa odontologia e foram eles que me moldaram como cirurgiã-dentista estomatologista. Cada um deles me ensinou algo e me acrescentou um olhar diferente sobre a vida. Aos **pacientes desta pesquisa, apenas** um agradecimento não seria justo.

Minha **família** é a grande responsável por eu estar neste percurso. Graças a eles eu sou privilegiada por me dedicar exclusivamente aos meus sonhos e ambições. Agradeço imensamente o apoio, confiança e torcida em todas as etapas da minha caminhada, amo vocês. Um agradecimento especial para meus amigos da pós graduação e da graduação em odontologia, por tornar o ambiente amigável e leve.

Por fim, gostaria de demonstrar minha eterna gratidão a todos meus mentores e professores que marcaram minha vida. A Professora **Kívia Linhares Ferrazzo** foi a responsável pela minha escolha profissional da docência, ela colocou o brilho no meu olho. Meus preceptores do Hospital A.C Camargo Câncer Center, obrigada por me tornarem estomatologista. Professores do Diagnóstico Bucal UFSC, **Profa. Elena Riet, Profa. Liliane Grando, Prof. Filipe Modolo e Rogério Gondak**, que oportunidade a minha aprender com você, são inspirações para a minha formação. E meu orientador, **Prof. Gustavo Davi Rabelo**, esse trabalho é fruto da sua mente mirabolante e fértil de pesquisador, gratidão por ter te conhecido e ser sua amiga, além de orientada. Obrigada por me acalmar e me direcionar a esse mundo da pesquisa, você é um cientista incomparável.

Agradecimentos institucionais: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ (número do processo 403656/2021-4), Fundação

de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina – **FAPESC** (pela bolsa de estudos), Núcleo de Odontologia Hospitalar – NOH/HU/UFSC/EBSERH nas pessoas das Profas. Dra. Alessandra Camargo e Dra. Aira Maria Bonfim Santos, Dra. Mariah Lisboa e Ms. Scheila Aust, Hospital Erasto Gaertner nas pessoas de Prof. Dra. Juliana Lucena Schussel, Prof. Dr. Laurindo Moacir Sassi e Residente João Paulo Prohny, Unidade de análises clínicas HU-UFSC/EBSERH nas pessoas de Dr. Sandro Wopereis e equipe de servidores responsáveis pela coleta de exames.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, **nunca tendo certeza do seu destino**”. (Leonardo da Vinci)

RESUMO

O objetivo do projeto foi avaliar o papel da Esclerostina nas osteonecroses dos maxilares (ON), juntamente com avaliação de outros parâmetros bioquímicos, radiográficos e clínicos. Pacientes foram selecionados de forma não randômica, pelo período de 15 meses, sendo incluídos àqueles diagnosticados com qualquer estágio de ON, com osteonecrose medicamentosa (ONM) ou osteorradiationecrose (ORN), atendidos em dois ambulatórios: no Núcleo de Odontologia Hospitalar do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC/EBSERH) e no Serviço de Cirurgia Bucomaxilofacial do Hospital Erasto Gaertner (grupo teste). Os pacientes foram avaliados clinicamente e tiveram a solicitação de radiografia panorâmica e exames sorológicos. História clínica pregressa, dados demográficos, modalidades de tratamento e demais informações foram acessadas do prontuário. A análise radiográfica foi qualitativa e quantitativa, sendo a última realizada em regiões de interesse (ROIs, 50x50 pixels): ROIs dos sítios lesionais e ROIs dos sítios comparativos (sem lesão - SL). As ROIs foram acessadas para avaliação de índices convencionais (média – Cinza_m e desvio-padrão – Cinza_DP dos tons de cinza) e para os índices não convencionais (dimensão fractal - FD e lacunaridade - Lac). Os marcadores séricos Esclerostina (pelo método de ELISA, pg/ml) e Fosfatase Alcalina (pelo método colorimétrico, U/L) foram avaliados, e o sangue coletado na mesma semana que a radiografia foi realizada. Um grupo controle foi selecionado apenas para a análise sérica, contendo 11 indivíduos sem diagnóstico de doenças osteometabólicas. A correlação foi avaliada pelo teste de Spearman e as comparações foram realizadas pelos testes T pareado e não pareado, Wilcoxon e Mann-Whitney. Análise multivariada de fatores foi feita para os marcadores séricos e os demais achados. Foram analisados 27 pacientes com ON, sendo oito pacientes apresentando ONM (feminino: 6, masculino: 2) e 19 apresentando ORN (feminino: 2, masculino: 17). A média de idade do grupo teste foi de 64,81 anos e do grupo controle foi de 52,45 ($p=0,001$). O nível sérico de Esclerostina foi maior no grupo ON comparado ao grupo controle (240,5 vs 30,5, $p<0,0001$). A fosfatase alcalina sérica foi maior no grupo controle comparado ao teste (86,45 vs 69,78, $p=0,02$). Sobre a análise radiográfica, Cinza_m não foi diferente entre os sítios com e sem lesão, mas Cinza_DP foi maior nos sítios lesionais (10,6 vs 8,3, $p=0,008$). FD e Lac não foram diferentes comparando sítios necróticos e sem lesão ($p=0,09$ e $p=0,25$, respectivamente). A análise multivariada para ORN mostrou relação da fosfatase alcalina com a etiologia da necrose, com a exodontia como fator desencadeante e com o número de sítios lesionais ($p<0,05$). Conclui-se que a Esclerostina desempenha um papel nas ON e seu nível sérico pode ser utilizado como marcador, estando aproximadamente oito vezes maior em indivíduos com osteonecrose. A fosfatase alcalina foi menor em pacientes com necrose óssea dos maxilares e teve relação com o fator desencadeador da necrose, número de sítios lesionais. Radiograficamente, uma maior variação nos tons de cinza foi observada nos sítios de necrose.

Palavras-chave: Osteonecrose, Fractais, SOST proteína humana, Estomatologia.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the role of Sclerostin in osteonecrosis of the jaws (ON), together with the evaluation of other biochemical, radiographic, and clinical parameters. Patients were selected in a non-random fashion, during a period of 15 months, including those diagnosed with any stage of ON, with medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) or osteoradionecrosis (ORN), treated at two clinics: at the Núcleo de Odontologia Hospitalar at the University Hospital Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC/EBSERH) and at the Oral and Maxillofacial Surgery Service at Erasto Gaertner Hospital (test group). The patients were clinically evaluated and were submitted to panoramic radiography and serological tests. Past clinical history, demographic data, treatment modalities, and other information were accessed from the medical record. The radiographic analysis was qualitative and quantitative, with the latter being carried out in regions of interest (ROIs, 50x50 pixels): ROIs of lesional sites and ROIs of comparative sites (no lesion - NL). The ROIs were accessed for the evaluation of conventional indices (mean – Gray_m and standard deviation – Gray_{SD} of gray level) and for non-conventional indices (fractal dimension - FD and lacunarity - Lac). The serum markers Sclerostin (by ELISA method, pg/ml) and Alkaline Phosphatase (by colorimetric method, U/L) were evaluated, and the blood was collected in the same week that the radiograph was performed. A control group was selected only for serum analysis, containing 11 individuals without a diagnosis of osteometabolic diseases. The correlation was assessed using Spearman's test and comparisons were performed using Paired and Unpaired t-tests, Wilcoxon, and Mann-Whitney tests. Multivariate analysis of factors was performed for serum markers and other findings. A total of 27 patients with ON were analyzed, 8 patients with MRONJ (female: 6, male: 2) and 19 with ORN (female: 2, male: 17). The mean age of the test group was 64.81 years and the control group was 52.45 (p=0.001). Serum sclerostin level was higher in the ON group compared to the control group (240.5 vs 30.5, p<0.0001). Serum alkaline phosphatase was higher in the control group compared to the test group (86.45 vs 69.78, p=0.02). On the radiographic analysis, Gray_m was not different between sites with and without the lesion, but Gray_{DP} was higher in lesional sites (10.6 vs 8.3, p=0.008). FD and Lac were not different comparing necrotic and non-injured sites (p=0.09 and p=0.25, respectively). The multivariate analysis showed a relationship between alkaline phosphatase and the etiology of necrosis, with tooth extraction as a triggering factor and with the number of lesional sites (p<0.05). It is concluded that Sclerostin plays a role in ON and its serum level can be used as a marker, being approximately eight times higher in individuals with osteonecrosis. Alkaline phosphatase was lower in patients with bone necrosis of the jaws and was related to the etiology of necrosis, number of lesional sites, and tooth extraction. Radiographically, higher variation in gray levels was observed in the necrosis sites.

Keywords: Osteonecrosis; Fractals; SOST protein, human; Oral medicine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tríade da teoria de Meyer	24
Figura 2 – Teoria fibroatrófica induzida pela radiação de Delanian.....	25
Figura 3 – Mecanismo de ação do DMAB	28
Figura 4 – Via Wnt/ β -catenina ativa e inativa.	34
Figura 5 – Diluição seriada das soluções padrões.	45
Figura 6 – Distribuição das soluções padrões na Placa de ELISA 96 poços, para obtenção da curva padrão.....	364
Figura 7 – Seleção das ROIs e Dados do Histograma.....	48
Figura 8 – Características clínicas e radiográficas das ON.....	53
Figura 9 – Média de idade entre o grupo ON (T) e o grupo sem lesão de ON (C)	53
Figura 10 – Comparação entre Valores da Esclerostina (pg/ml) nos grupos com lesão de ON (T) e sem lesão de ON (C)	53
Figura 11 – Comparação entre Valores da Fosfatase Alcalina (U/L) nos grupos com lesão de ON (T) e sem lesão de ON (C)	53
Figura 12 – Valores dos pixels de cinza nos grupos com lesão de ON (N) e sem lesão de ON (SL).....	55
Figura 13 – Dimensão Fractal nos grupos com lesão de ON (N) e sem lesão de ON (SL)..	55
Figura 14 – Lacunaridade nos grupos com lesão de ON (L) e sem lesão de ON (SL)	55
Figura 15 – Matriz de correlação.....	56
Figura 16 – Valores de FosfA de acordo com a quantidade de sítios.	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Estadiamento ONM	19
Quadro 2 – Estadiamento ORN	20
Quadro 3 – BPs mais utilizados e suas principais características	26
Quadro 4 – Posologia e indicações do DMAB	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Coeficiente de correlação intraclasse	53
Tabela 2 – Matriz de análise multivariada de fatores	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D-RT	Radioterapia convencional ou bidimensional
3D-RT	Radioterapia tridimensional
AAOMS	Associação Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais
ABPs	Aminobisfosfonatos
AF	Análise Fractal
APC	Polipose adenomatosa Coli
ATP	Adenosina Trifosfato
AXIN2	Proteína-esqueleto
BAP	Fosfatase Alcalina específica do Osso
BMP	Proteínas Morfogenéticas do Osso
BPs	Bisfosfonatos
C	Grupo controle
CEO	Carcinoma epidermoide oral
Cinza_DP	Desvio padrão dos valores de Cinza
Cinza_M	Média dos valores de cinza
CK1	Proteína quinase1
DMAB	Denosumabe
DMO	Densidade mineral óssea
DO	Densitometria óssea
DRC	Doença Renal Crônica
DSH	<i>Dishevelled</i>
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FD	Dimensão Fractal
FosfA	Fosfatase Alcalina
FZD	Receptor <i>Frizzled</i>
GSK3	Glicogênio sintase quinase 3
Gy	Grays
HM	Hipercalcemia maligna
ICC	Índice de Confiabilidade Intraclasse
IGRT	Radioterapia guiada por imagem
IHQ	Imuno-histoquímica
IMRT	Radioterapia de intensidade modulada

Lac	Lacunaridade
LEF	Família do fator de intensificação linfóide
LRP5/6	Proteína-5/6
Micro-CT	Microtomografia
MM	Mieloma múltiplo
mRNA	RNA mensageiro
N	Sítio lesional de necrose
N-ABPs	Não Aminobisfosfonatos (Não nitrogenados)
ON	Necrose óssea ou osteonecrose
ONM	Necrose óssea dos maxilares associada a medicamentos
OPG	Osteoprotegerina
ORN	Osteorradionecrose
PRF	Plasma rico em fibrina
PTH	Hormônio paratireoide
RANKL	Ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa B
RI	Radiação ionizante
ROI	Região de interesse
RT	Radioterapia
SL	sítio livre de lesão
T	Grupo teste
TC	Tomografia computadorizada
TCF	Família do fator de células T
VBD	Doença de Van Buchem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	NECROSES ÓSSEAS DOS MAXILARES	19
2.1.1	Radiação Ionizante e ORN	22
2.1.2	Medicações Antirreabsortivas e ONM	25
2.2	DINÂMICA ÓSSEA E MARCADORES ÓSSEOS	31
2.3	ÍNDICES RADIOGRÁFICOS NÃO CONVENCIONAIS: ANÁLISE FRACTAL E LACUNARIDADE	38
3	OBJETIVOS	42
3.1	OBJETIVO GERAL	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	43
4.2	COLETA DE DADOS	44
4.3	ANÁLISE SÉRICA DA ESCLEROSTINA E FOSFATASE ALCALINA	44
4.4	PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE RADIOGRAFIAS	47
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
5	RESULTADOS	52
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÃO	65
8	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

A osteonecrose (ON) dos maxilares, do tipo osteorradionecrose (ORN) ou osteonecrose medicamentosa (ONM) são complicações do tratamento com radioterapia em região de cabeça e pescoço e medicações antirreabsortivas, respectivamente (CHRONOPOULOS et al., 2018a; MARX, 2003). Ambas são definidas clinicamente como osso exposto ou osso que pode ser sondado através de uma fístula intraoral ou extraoral e que persiste por mais de oito semanas e sem qualquer evidência de neoplasia persistente ou recorrente na área (CHRONOPOULOS et al., 2018b; RUGGIERO et al., 2014, 2022).

As necroses ósseas dos maxilares são complicações de difícil manejo, que alteram a qualidade de vida do paciente, podendo levar a perdas dentárias ou de estrutura óssea, além de dificuldades na fala e alimentação, levando a uma situação de desafio para reabilitação oral de pacientes que apresentam estas condições. Por esse motivo, vários estudos investigaram estratégias auxiliares no diagnóstico destas condições, isto é, sem a necessidade de manipulação óssea, como exemplo, acessando biomarcadores séricos do osteometabolismo (MORASCHINI et al., 2019). Os biomarcadores bioquímicos e proteicos usados para doenças osteometabólicas e que também são usados para necroses ósseas discutidos na literatura incluem o C-telopeptídeo, N-telopeptídeo, fosfatase alcalina específica do osso (BAP), osteocalcina, hormônio da paratireoide intacta (PTH), ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa B (RANKL), osteoprotegerina (OPG), triiodotironina, tiroxina, hormônio estimulador da tireoide e 25-hidroxivitamina D (WADIA, 2019). Porém, atualmente, não existem biomarcadores preditivos, ou mesmo, norteadores de conduta, que tenham validade e acurácia comprovada em estudos bem delineados e com evidência científica robusta.

Biomarcadores clássicos utilizados para osteoporose e outras condições osteometabólicas são utilizados como auxiliares no monitoramento da remodelação óssea e, conseqüentemente, das necroses dos maxilares. A fosfatase alcalina, por exemplo, é uma enzima de membrana, e cerca de 50% dela é expressa pelos osteoblastos, enquanto a outra parte é expressa pelos hepatócitos. Porém, devido sua inespecificidade, outros biomarcadores e parâmetros devem ser adicionados

para avaliação óssea (YOKOTA et al., 2020). Os autores Chapurlat e Confavreux (2016), propuseram o estudo de novos marcadores bioquímicos mais específicos para o osso, de formação ou de reabsorção, presentes em diferentes níveis na remodelação óssea, e conseqüentemente úteis na exploração de relações fisiológicas e patológicas entre o tecido ósseo e outros órgãos. Dentre a proposta do uso de marcadores específicos, existe a Esclerostina.

A Esclerostina já vem sendo estudada como biomarcador sérico de algumas condições como doença renal crônica e osteoporose, bem como outras alterações esqueléticas e vasculares (PELLETIER; JEAN; FOUQUE, 2015; SCHIAVI, 2015), no entanto, majoritariamente ainda em pesquisas, e não ainda incorporada na rotina clínica. Ainda, não há na literatura estudos associando os níveis de Esclerostina com a ORN e ONM, ou seja, avaliando este marcador especificamente para estas lesões dos ossos maxilares. A Esclerostina é uma glicoproteína produto do gene SOST, expressa principalmente pelos osteócitos, e é caracterizada como um potente inibidor da formação óssea. A Esclerostina antagoniza a via canônica Wnt/beta-catenina, via esta que atua modulando a atividade dos osteoblastos. Diante disso, a expressão de Esclerostina resulta na inibição da diferenciação osteoblástica, com conseqüente estimulação da apoptose dos mesmos (BARON; RAWADI, 2007). Ainda, atua como inibidor das proteínas morfogenéticas do osso (BMP, do inglês *Bone morphogenetic proteins*) e é expressa no mecanismo regulador ósseo ligado à propriedade mecanossensora dos osteócitos (SAPIR-KOREN; LIVSHITS, 2014).

Para além de marcadores séricos, manobras de diagnóstico e monitoramento de doenças ósseas são amplamente utilizadas in vivo, principalmente, por meio dos exames de imagem obtidos com a utilização de Raios X. Apesar de não reconhecermos sinais radiográficos patognomônicos das necroses, na literatura encontramos estudos que avaliam sinais radiográficos específicos, nas necroses ósseas, como osteólise, osteosclerose, presença de áreas mais radiodensas, espessamento da lâmina dura, deposição de osso subperiosteal, falha da remodelação pós-operatória com persistência do alvéolo, realce do canal mandibular e envolvimento sinusal (IZZETTI et al., 2023; KLINGELHÖFFER et al., 2016). Além destes parâmetros convencionais, a tecnologia digital atual e os métodos de análise de imagens radiográficas permitem a medição das alterações no osso alveolar e avaliação de parâmetros não convencionais através de softwares

gratuitos e sofisticados nos entregando análises de organização trabecular e complexidade óssea (KATO et al., 2020).

Existe um parâmetro que vem sendo amplamente utilizado em pesquisas clínicas e experimentais. A análise fractal é uma metodologia que permite mensurar a Dimensão Fractal (FD, do inglês *Fractal Dimension*), que por meio de cálculos matemáticos permitem a avaliação de estruturas complexas, incluindo o osso trabecular. O índice numérico da FD corresponde com a organização espacial das trabéculas e sua complexidade (CHEN et al., 1994; WHITE; RUDOLPH, 1999).

Em suma, por meio de inúmeras metodologias, pode-se avaliar a qualidade óssea em diversas situações. Na condição *in vivo*, diretamente no paciente, diversas são as tentativas em se acessar a qualidade óssea sistêmica e/ou local, e entender quais parâmetros alterados podem estar relacionados com o surgimento e/ou agravamento de uma doença. No caso das osteonecroses dos maxilares não é diferente, então, parece que uma análise multimodal seria necessária para avaliar pacientes com ON em maxila e mandíbula, a fim de entender melhor esta condição e identificar possíveis marcadores que poderiam predizer agravamento ou melhora no osso e no quadro como um todo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para melhor organização do tema central do trabalho, as seguintes seções abordam a revisão da literatura atual.

2.1 NECROSES ÓSSEAS DOS MAXILARES

A osteonecrose é uma condição na qual as células vivas dos ossos e da medula óssea são reduzidas, levando ao colapso do osso e sua consequente necrose. O termo "osteonecrose" foi usado pela primeira vez na literatura médica para descrever a necrose avascular da cabeça do fêmur. Mais tarde, após o acometimento dos ossos maxilares, a nomenclatura foi denominada "osteonecrose dos maxilares". As duas principais etiologias da osteonecrose dos maxilares que foram escritas na literatura são a osteonecrose dos maxilares relacionada à medicação (ONM) e a osteorradionecrose (ORN).

Tanto a ORN como a ONM apresentam as mesmas características clínicas e radiográficas. Ambas devem ser diagnosticadas correlacionando dados da anamnese com aspecto clínico e imaginológico da alteração óssea. A ONM pode ser definida com a inclusão de 3 critérios: (1) Tratamento atual ou anterior com terapia antirreabsortiva isoladamente ou em combinação com imunomoduladores ou medicamentos antiangiogênicos; (2) Osso exposto ou osso que pode ser sondado através de uma fístula intraoral ou extraoral na região maxilofacial que persiste por mais de 8 semanas; (3) Sem história de radioterapia nos maxilares ou doença metastática nos maxilares (RUGGIERO et al., 2014). E a ORN também segue uma definição semelhante: osso irradiado exposto que não cicatriza em um período de 3 meses sem evidência de tumor persistente ou recorrente e pode levar a uma fratura patológica do osso envolvido (CHRONOPOULOS et al., 2018^a; MARX, 1983). A classificação das alterações está ilustrada nos quadros a seguir (Quadro 1 e 2).

Quadro 1 – Estadiamento ONM.

Estágio	Definição
Em risco	Nenhum osso necrótico aparente em pacientes assintomáticos que foram tratados com terapia antirreabsortiva por via intravenosa (IV) ou Oral.
Estágio 0	Pacientes sem evidência de osso necrótico, mas que apresenta achados clínicos e radiográficos.

	<p style="text-align: center;">Sinais e Sintomas</p> <ul style="list-style-type: none"> •Odontalgia não explicada por causa odontogênica; •Dor óssea em mandíbula com irradiação para articulação temporomandibular; •Dor sinusal; •Função neurossensorial alterada. <p style="text-align: center;">Achados radiográficos</p> <ul style="list-style-type: none"> •Perda ou reabsorção alveolar não relacionada a doença periodontal crônica; •Alteração no padrão trabecular de osso esclerótico e ausência de osso neoformado em alvéolos após exodontias; •Osteoesclerose, espessamento/obscurecimento do ligamento periodontal e espessamento da lâmina dura.
Estágio 1	Osso exposto e necrótico ou fístula que atinge o osso em pacientes assintomáticos e sem evidência de infecção/inflamação. Esses pacientes também podem apresentar achados radiográficos mencionados para o Estágio 0 localizados na região do osso alveolar.
Estágio 2	Osso exposto e necrótico, ou fístula que atinge o osso, com evidência de infecção/inflamação. Esses pacientes são sintomáticos. Esses pacientes também podem apresentar achados radiográficos mencionados para o Estágio 0 localizados na região do osso alveolar.
Estágio 3	Osso exposto e necrótico ou fístula que penetra no osso, com evidência de infecção e um ou mais dos seguintes: <ul style="list-style-type: none"> •Osso necrótico exposto que se estende além da região do osso alveolar (ou seja, borda inferior e ramo na mandíbula, seio maxilar e zigoma na maxila) •Fratura patológica. •Fístula extraoral. •Comunicação oral antral/oral-nasal. •Osteólise estendendo-se até a borda inferior da mandíbula ou assoalho do seio.

Fonte: Adaptado de Ruggiero et al., (2022)

Quadro 2 – Estadiamento ORN

Estágio	Definição
Estágio 1	Ulceração mínima dos tecidos moles e osso cortical exposto limitado.
Estágio 2	<p>Tanto o osso cortical exposto quanto uma porção do osso medular subjacente (sombreado) estão necróticos.</p> <p>2.A: há uma pequena úlcera na mucosa.</p> <p>2.B: há necrose de tecidos moles, incluindo fístula orocutânea.</p>
Estágio 3	Osso necrótico difuso, clinicamente exposto verificado por técnicas de imagem, juntamente com fístulas cutâneas e infecção

Fonte: Adaptado de Schwartz e Kagan (2002)

Além da exposição óssea, podem ocorrer sintomas como dor, inchaço dos tecidos moles adjacentes e complicações como formação de abscessos e até mesmo fraturas patológicas. Quando os tecidos necróticos sofrem superinfecção, os pacientes podem experimentar uma dor intensa e em casos graves, as infecções locais podem progredir nos espaços profundos da cabeça e do pescoço, com características potencialmente fatais (RUGGIERO et al., 2022). As características radiográficas da lesão de necrose em si são consideradas inespecíficas, ou seja, são características de destruição óssea, associada a áreas de esclerose e desorganização óssea por outras abordagens, por isso outros índices radiográficos podem favorecer melhor acurácia na identificação desta condição (IZZETTI et al., 2023).

A detecção de sinais radiográficos específicos em radiografias panorâmicas odontológicas parece ser uma abordagem interessante para tentar prever o risco do paciente a desenvolver ORN e ONM, principalmente a ONM. A suposição de que sinais específicos podem ser encontrados baseia-se no modo de ação dos antirreabsortivos, que levam ao ganho de massa óssea (ARCE et al., 2009; KUBO et al., 2018). Na literatura encontramos estudos que avaliam sinais radiográficos específicos, como osteólise, osteosclerose, tecido ósseo denso, espessamento da lâmina dura, deposição de osso subperiosteal e falha da remodelação pós-operatória (IZZETTI et al., 2023; KLINGELHÖFFER et al., 2016).

Mas parece que somente a avaliação dos sinais radiográficos convencionais não são suficientes para o auxílio no manejo das necroses. Izzetti *et al.*, (2023) avaliaram os sinais radiográficos de ORN na radiografia panorâmica com o objetivo de descrever as características das lesões em diferentes estágios da doença. Porém, os pesquisadores observaram uma fraca relação entre os sinais radiográficos e o estágio da doença. Assim, com a ajuda da tecnologia digital atual e os métodos de análise de imagem é possível realizarmos a medição das alterações no osso alveolar através de *softwares*, como a análise fractal que será discutida na seção 2.3.

O tratamento das necroses dos maxilares inclui medidas conservadoras e cirúrgicas. O tratamento cirúrgico consiste no desbridamento cirúrgico de toda extensão necrótica do osso e o fechamento do tecido mole por primeira intenção, utilizando ou não vias auxiliares como membranas, células tronco e o plasma rico em fibrina (PRF). O tratamento conservador inclui enxaguatórios bucais

(enxaguantes salinos ou clorexidina a 0,02%) e antibióticos sistêmicos, juntamente com a remoção suave do sequestro sobre a lesão, ozonioterapia e terapia fotodinâmica antimicrobiana com a laserterapia de baixa intensidade (CHRONOPOULOS et al., 2018a; KALITA et al., 2023). O regime terapêutico que inclui pentoxifilina e tocoferol atua sinergicamente e age como um potente agente antifibrótico que ajuda a reverter as alterações relacionadas à fibrose induzida por radiação, mas que também tem apresentado resultados satisfatórios em ONM (SEO et al., 2020). A oxigenoterapia hiperbárica (OHB) foi descrita como adjuvante no tratamento, mas ainda não há consenso na literatura sobre sua ação isolada no manejo das necroses (RUGGIERO et al., 2022).

2.1.1 Radiação Ionizante e ORN

A radioterapia (RT) é uma modalidade de tratamento oncológico caracterizada pela utilização de radiação ionizante (RI) com a finalidade de reduzir ou eliminar células tumorais. A RI age a nível celular, levando a quebra de moléculas do DNA, interrupção da duplicação e podendo levar a apoptose. A RT é utilizada na região de cabeça e pescoço para o tratamento do Carcinoma Epidermóide Oral (CEO), mais corriqueiramente. O tratamento com RT pode ser adjuvante, curativo e/ou paliativo, e pode estar associado com outras modalidades oncológicas, a depender do estágio da doença (DERER et al., 2015). A RI pode causar diversos danos, pois células saudáveis vizinhas ao tumor também são atingidas. Os efeitos adversos orais provenientes da RT são dependentes da dose aplicada (medida em Grays-Gy), da técnica de RT e da localização do tumor.

Geralmente, os pacientes com neoplasias de cabeça e pescoço são irradiados com altas doses, entre 66 a 74 Gy. Essa dose total normalmente é fracionada, uma vez ao dia, cinco dias na semana, sendo a dose diária no tumor em torno de 2 Gy (ALFOUZAN, 2021). Existem diversas técnicas de radioterapia, a radioterapia convencional ou bidimensional (2D-RT), que já é considerada obsoleta por não utilizar um exame de imagem tridimensional para guiar o campo de radiação. A radioterapia tridimensional (3D-RT) é uma evolução da 2D-RT e utiliza a tomografia computadorizada para localizar a região a ser tratada (irradiada) e ainda é empregada em serviços públicos de saúde. Estudos demonstram que a radioterapia de Intensidade Modulada (IMRT) é a preferência no tratamento para

tumores de cabeça e pescoço, ela é uma técnica mais recente que modula altas doses somente na área tumoral, com essa técnica é possível irradiar o tecido alvo com uma alta dose de radiação e, ao mesmo tempo, poupar tecidos saudáveis da radiação (MALLICK; WALDRON, 2009). A Radioterapia guiada por imagem (IGRT) utiliza a mesma técnica da IMRT, porém, ela é guiada por uma tomografia computadorizada realizada diariamente antes do procedimento e seu objetivo é melhorar a acurácia de dose no local tumoral todos os dias (KEARNEY; COFFEY; LEONG, 2020).

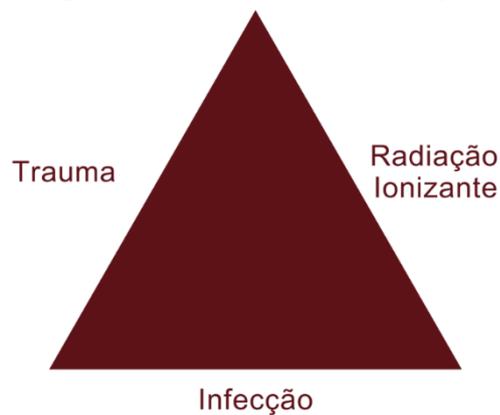
Os efeitos adversos da radiação podem ser agudos e tardios. Os efeitos agudos que ocorrem durante o tratamento são: mucosite oral, hipossalivação, trismo, infecções oportunistas e alteração de paladar. Os efeitos agudos podem perdurar e se tornarem tardios, como a hipossalivação e o trismo, já os efeitos tardios são: osteorradionecrose e cárie de radiação (ORTIGARA et al., 2021). A ORN foi descrita pela primeira vez por Regaud (1922) e é considerada uma das complicações orais tardias mais graves ao paciente. A ORN dos maxilares é definida como osso exposto irradiado que não cicatriza em um período de três meses sem qualquer evidência de neoplasia persistente ou recorrente na área (CHRONOPOULOS et al., 2018a).

Os primeiros três anos após a conclusão do tratamento radioterápico são aqueles onde a ORN é mais frequentemente registrada, com uma prevalência de 20-22%. A mandíbula posterior é o local mais acometido pela ORN, devido ao osso relativamente denso da mandíbula e à vascularização limitada (KALITA et al., 2023). Devido a trauma, infecções de extrações e doença periodontal, respectivamente, a incidência de ORN é três vezes maior em indivíduos dentados em comparação com pacientes edêntulos. Entre os fatores de risco para o desenvolvimento de ORN estão o local do tumor primário, a proximidade do tumor ao osso, trauma agudo de procedimentos cirúrgicos na mandíbula, abuso de tabaco e álcool, a quantidade de mandíbula incluída no campo de radiação primário, o estado da dentição (doença odontogênica e periodontal), má higiene bucal, doses de radiação superiores a 60 Gy, extrações dentárias, má nutrição, quimioterapia concomitante à RT, uso de braquiterapia e prótese mal ajustada que causa trauma crônico (KALITA et al., 2023; WAN et al., 2020).

A patogênese da osteorradionecrose foi apresentada por diversas teorias com o passar do tempo e conforme foi sendo estudada. Na teoria mais antiga, de

1970, Meyer publicou uma tríade (Infecção, trauma e radiação) (Figura 1) que explicaria o desenvolvimento da ORN. De acordo com ele, o trauma cria uma quebra da barreira física entre o meio externo e interno (osso). Os traumas mais associados com a ORN são exodontias, alveolectomias e procedimentos cirúrgicos com manipulação óssea. Essa abertura favorece a instalação da flora microbiana no osso irradiado. A radiação causa efeitos deletérios nas células da medula óssea e na vascularização. E, por fim, a infecção é causada devido à dificuldade de resposta deste osso alterado frente a instalação de microrganismos na área (MEYER, 1970).

Figura 1 – Tríade da teoria de Meyer



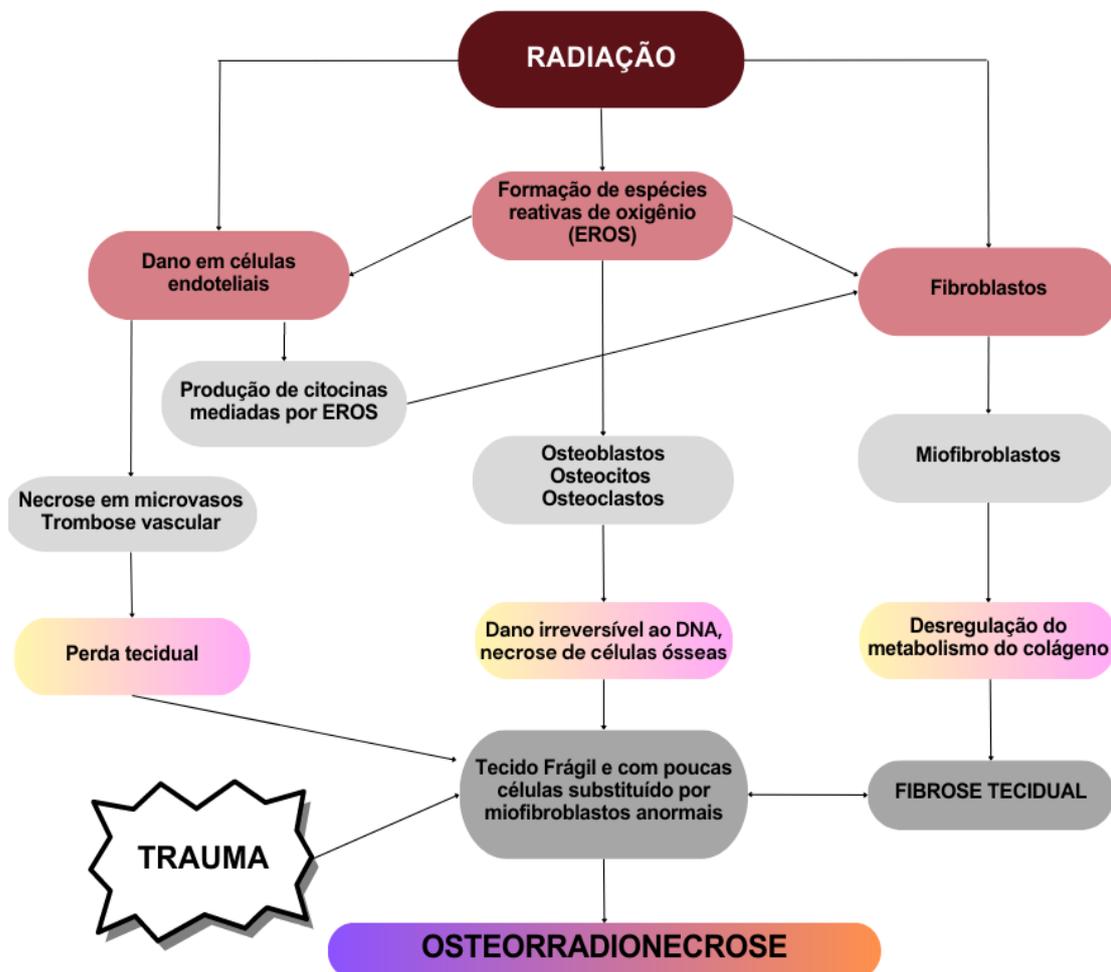
Fonte: Adaptado de Suryawanshi et al. (2014).

O mecanismo mais relatado na literatura é do desenvolvimento de um ambiente hipocelular, hipovascular e hipóxico (a teoria dos três Hs de Marx) levando a uma degradação dos tecidos envolvidos e ao resultado patológico. De acordo com essa teoria, a infecção e os microrganismos não são fatores determinantes para a ORN, estes atuam apenas como contaminantes superficiais (MARX, 1983). Outra teoria, proposta por Brás (1990) corrobora para uma necrose vascular, isto é, ele categorizou a osteorradionecrose como do tipo isquêmica, pois suas análises de fragmentos ósseos irradiados mostraram obstrução da artéria alveolar inferior por fibrose do vaso e áreas de trombose.

Já Delanian e Lefaix (2002) defenderam a teoria da fibrose por radiação, a mais aceita na comunidade científica até hoje, onde a radiação induz um processo fibroatrofítico nas células endoteliais e células do tecido conjuntivo. Esta teoria é baseada em um desequilíbrio entre a síntese e a degradação do tecido ósseo

irradiado. Esse processo é baseado em três fases (Figura 2), na primeira ocorre o dano celular endotelial e uma reação inflamatória aguda, liberando citocinas inflamatórias e formando edema. A segunda fase é chamada de fase organizada constitutiva, nela ocorre uma atividade fibroblástica anormal e consequente desorganização da matriz extracelular. Por fim, a última fase, chamada de fibroatrófica tardia, nela há a tentativa de reparo, havendo formação de tecido cicatricial friável e frágil. Esse tecido alterado é mais suscetível a novos quadros de reações inflamatórias tardias, caso haja algum trauma em boca.

Figura 2 – Teoria fibroatrófica induzida pela radiação de Delanian.



Fonte: Adaptado de Suryawanshi et al., (2014).

2.1.2 Medicções Antirreabsortivas e ONM

Medicamentos antirreabsortivos são denominados assim devido a sua capacidade de inibir ou estacionar a reabsorção óssea, através da inativação osteoclástica por diversos mecanismos. Os principais medicamentos antirreabsortivos associados à ONM e que serão abordados nessa seção são os Bisfosfonatos (BPs) e o Denosumabe (DMAB).

Os BPs são medicamentos eficazes no tratamento de alterações do esqueleto e doenças ósseas relacionadas ou não ao câncer, sendo as principais relacionadas ao câncer: hipercalcemia maligna (HM), osteopenia secundária ao tratamento oncológico, fratura patológica devido a metástases ósseas, metástases e mieloma múltiplo (MM); e aquelas não relacionadas ao câncer: osteoporose, doença de Paget e osteogênese imperfeita (RUGGIERO et al., 2022). Os Bps são análogos sintéticos do pirofosfato (P-O-P), este é um antirreabsortivo natural com baixa disponibilidade e durabilidade devido à susceptibilidade em sofrer degradação enzimática. Devido a isso, nos BPs, há um átomo de carbono no centro das cadeias (P-C-P), deixando-o resistente à degradação enzimática e levando a longa disponibilidade metabólica (PAPAPOULOS, 2006). Os BPs são classificados de acordo com a estrutura molecular de suas cadeias laterais, podendo conter ou não o átomo de Nitrogênio. Os BPs nitrogenados, também chamados de aminobisfosfonatos (ABPs), são mais potentes e mais atuais em comparação com os não nitrogenados (N-ABPs), existem vários tipos, vias de administrações e indicações (Quadro 3) (RUGGIERO et al., 2014, 2022).

Quadro 3 – BPs mais utilizados e suas principais características.

Bisfosfonato		Nome comercial	Via	Dose	Indicações	Potência
Nitrogenados	Ácido Zoledrônico	Aclasta®	IV	5mg Semestral	Osteoporose	10.000x
		Zometa®	IV	4mg Trimestral Mensal	Metástases ósseas, MM e HM	10.000x
	Alendronato de Sódio	Fosomax® Osteoform®	Oral	70mg/sem 10mg/dia	Osteoporose	500x
				400mg/dia por 6 meses	Paget	500x
	Ibandronato de Sódio	Boniva®	Oral	150mg/mês	Osteoporose	1000x
	Pamidronato	Aredia®	IV	60mg	Metástases	100x

	de Sódio				ósseas, MM e HM	
	Risedronato de Sódio	Actonel®	Oral	35mg/mês 5mg/dia	Osteoporose	2000x
Se m Nitr ogê nio	Etidronato	Didronel®	IV	400mg/dia	Paget	1x
	Tiludronato	Skelid®	Oral	400mg/dia	Paget	10x
	Clodronato	Bonefos®	IV	300mg/dia	Metástases; neoplasias ósseas	10x

Fonte: Adaptado de Fernandes, Leite e Lanças (2005) e Papapoulos (2006).

Os BPs são distribuídos por todo o corpo através da corrente sanguínea, armazenados nos ossos e excretados pelos rins inalterados, devido sua resistência à degradação enzimática e química. Eles têm uma forte afinidade por cristais de hidroxiapatita (HAP), por isso ligam-se à superfície dos ossos. Essa capacidade de se ligar fortemente ao mineral ósseo dá aos BPs a propriedade única de direcionamento seletivo para o órgão-alvo pretendido, o colocando em contato próximo com os osteoclastos. Uma vez que os BPs penetram no osso e os osteoclastos preenchem as lacunas de Howship, eles se fixam firmemente ao osso e podem permanecer lá por anos. A liberação de BPs do osso depende em grande parte dos processos contínuos de remodelação e reabsorção óssea (BARON; FERRARI; RUSSELL, 2011; RUSSELL et al., 2008).

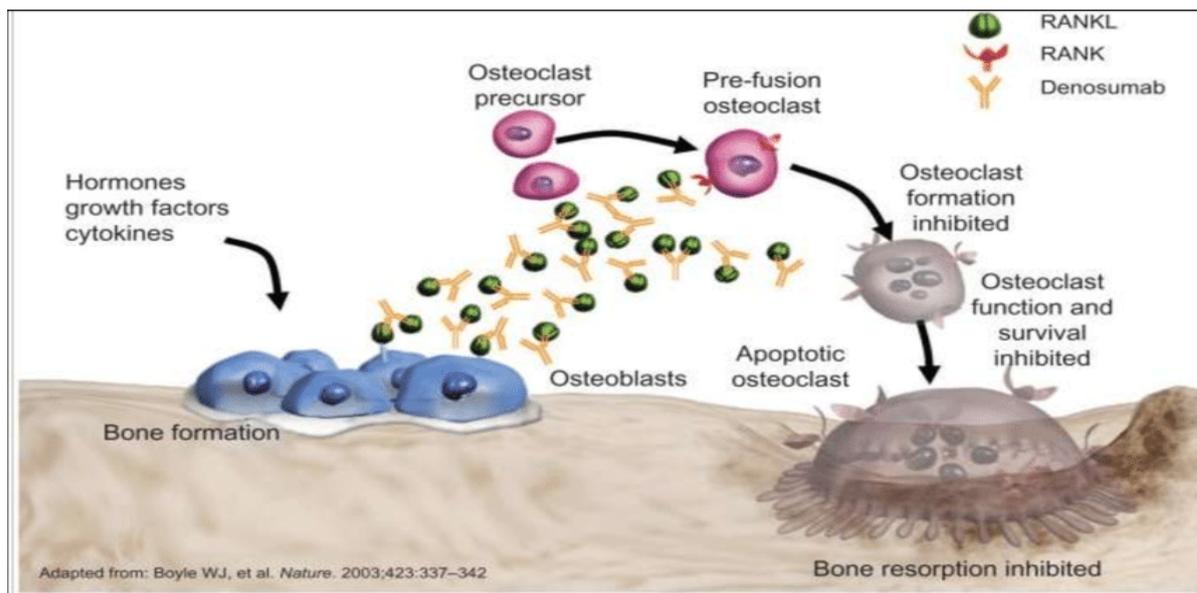
É importante notar que a literatura muitas vezes interpreta mal e apresenta valores de meia-vida dos BPs, levando a equívocos. Alegações de meias-vidas superiores há 10 anos não são comparações válidas quando consideradas as meias-vidas mais curtas observadas na corrente sanguínea. Sabe-se que as meias-vidas dessas drogas não são equivalentes as meias-vidas de seus efeitos e a sua excreção é mais bem descrita pela cinética multiexponencial ou função de potência, havendo uma sequência de “meias-vidas” observada com o aumento do tempo. Por isso, quanto mais tempo o estudo for continuado, mais longa se torna a meia-vida terminal. Sua influência pode continuar moldando a saúde óssea, mesmo depois de sua presença física ter diminuído (ROGERS; MÖNKKÖNEN; MUNOZ, 2020; RUSSELL et al., 2008).

Os N-ABPs, como etidronato, clodronato e tiludronato, são metabolizados no citosol dos osteoclastos em análogos da Adenosina Trifosfato (ATP) que induzem a apoptose dos osteoclastos. Já os aminobisfotonatos atuam em todas as células do

tecido ósseo, não só nos osteoclastos, como muitos descrevem. No osteoclasto, os ABPs inibem uma enzima chamada farnesil difosfato sintase, esta enzima forma metabólitos que realizam a prenilação das proteínas na via do mevalonato, permitindo a ligação de proteínas na membrana celular. Com esse processo inibido, o osteoclasto altera sua morfologia, perdendo sua borda em escova (que facilita sua função fagocitária) e pode ocorrer o processo de apoptose. Sob ação dos ABPs, os osteoblastos passam a cessar o recrutamento dos osteoclastos, de forma parácrina. Já os osteócitos ficam mais resistentes à morte, impedindo o recrutamento dos osteoclastos para reabsorção de seus restos (ROGERS; MÖNKKÖNEN; MUNOZ, 2020).

O outro antirreabsortivo que vem sendo utilizado é o DMAB, ele é um anticorpo monoclonal totalmente humanizado que age contra o ligante RANK (RANKL) e inibe a função dos osteoclastos, ele mimetiza a função da osteoprotegerina (OPG) na via da osteoclastogênese. A ligação RANKL-OPG ou RANKL-DMAB bloqueia a diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos e a atividade destes (Figura 3).

Figura 3 – Mecanismo de ação do DMAB.



Fonte: Boyle, Simonet e Lacey (2003) e Lipton et al., (2012).

O DMAB, por ser um anticorpo, apresenta algumas vantagens em relação aos BPs, como meia vida menor, uma inibição reversível de RANKL, é eliminado do

organismo em cerca de 26 dias e 9 meses após a aplicação os marcadores ósseos tendem a voltar aos valores pré-tratamento. Em particular, não há evidências de ligação sustentada de DMAB às superfícies ósseas. (BARON; FERRARI; RUSSELL, 2011; HANLEY et al., 2012). A Associação Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais (AAOMS) publicou em 2022 seu último *update* sobre as ONM, onde relatam que os inibidores de RANK-L não se ligam ao osso, como os BPs, e seus efeitos na remodelação óssea são diminuídos principalmente dentro de 6 meses após a interrupção do tratamento, deixando uma janela de segurança para procedimentos odontológicos invasivos após 6 meses da interrupção do tratamento (RUGGIERO et al., 2022). A posologia e indicações do Denosumabe estão descritas no quadro 4.

Quadro 4 – Posologia e indicações do DMAB.

Denosumabe	Nome comercial	Via	Posologia	Indicações
	Prolia®	Subcutâneo	60mg Semestral	Osteoporose, osteopenia
	Xgeva®	Subcutâneo	120mg Mensal Trimestral	MM, Metástase óssea e HM

Fonte: Adaptado de Ruggiero et al., (2022).

Estes medicamentos (BPs e DMAB), devido à sua característica antirreabsortiva, alteram a homeostase óssea e o processo de remodelação óssea desencadeando a osteonecrose medicamentosa dos maxilares (ONM). A ONM pode ocorrer espontaneamente ou frente a procedimentos odontológicos que envolvem a manipulação óssea e demandam os processos fisiológicos de remodelação, como exodontias, implantes, etc. A patogênese do surgimento da ONM permanece incerta, mas parece depender de cada medicação, visto que cada uma age de forma diferente, como já foi explicado anteriormente (ALLEN; BURR, 2009). Embora a hipótese levantada de que o tecido mole da mucosa oral poderia desempenhar um papel significativo, o osso é provavelmente o tecido primário de interesse para o aparecimento da necrose associada aos bisfosfonatos. Especificamente, foi proposto que os bisfosfonatos, que se acumulam no osso, têm efeitos tóxicos diretos no epitélio oral e inibem a cicatrização normal de lesões de tecidos moles causadas por intervenção dentária ou algum outro trauma (REID; BOLLAND; GREY, 2007).

Shaocheng et al., (2017) relataram que o uso prolongado de BPs reduz a chance de fraturas osteoporóticas, no entanto, pode alterar algumas de suas propriedades. Sabe-se que o osso apresenta reduzida resistência mecânica com o uso prolongado destas drogas, e isso foi associado com alterações microestruturais, que podem explicar o mecanismo pelo qual as fraturas patológicas ou fraturas atípicas ocorrem em pacientes tratados com bisfosfonatos, havendo uma supressão severa da remodelação óssea e falta de remodelação alvo-direcionada. O alvo aqui sendo os microdanos ósseos, classificados basicamente em microfissuras ou microcracks, microfraturas e danos difusos. Assim, os BPs podem suprimir a remodelação, resultando no acúmulo destas microfissuras, propiciando também um ambiente favorável para as microfraturas. Entende-se que, se esse acúmulo de microdanos acontece nos ossos longos, seria possível que isso também acontecesse nos ossos maxilares.

Outro ponto intrigante e interessante da ONM é a exclusividade do acometimento dos ossos gnáticos. Em pacientes recebendo medicamentos antirreabsortivos, a osteonecrose nunca foi relatada em ossos longos. Diversas hipóteses principais de patogênese e fisiopatologia tentam explicar essa especificidade, como: proximidade óssea com meio externo contaminado juntamente com a inibição da remodelação óssea e doenças orais, como a periodontite (RUGGIERO et al., 2022). Agora é amplamente aceito que a má higiene oral e a infecção bacteriana crônica da superfície óssea contribuem para a gravidade da doença. A hipótese também segue a ideia de que, como a remodelação é alta na mandíbula e os antirreabsortivos suprimem a remodelação, isso provavelmente desempenha um papel na fisiopatologia na ONM (KUEHN; SCARIOT; ELSALANTY, 2023). Aliás, as taxas de remodelação óssea intracortical da mandíbula são 10 a 20 vezes maiores do que no córtex da crista ilíaca (ALLEN; BURR, 2009).

Estudos sugerem que a combinação da medicação antirreabsortiva com inflamação ou infecção é suficiente para induzir a ONM. Entretanto, à medida que mais pesquisas são realizadas nessa área, fica cada vez mais evidente que a fisiopatologia dessa doença é multifatorial e várias hipóteses podem explicá-la a depender dos fatores de risco. Além disso, a presença de inflamação ou infecção, inibição da angiogênese, disfunção imune inata ou adquirida e predisposição genética são citados como fatores de risco e predisponentes (RUGGIERO et al., 2022).

Sabe-se que os fatores de risco são inerentes ao tratamento e ao próprio paciente. Por exemplo, segundo Ruggiero (2022), o primeiro parâmetro a se avaliar é a indicação do tratamento com estas medicações. Sendo o grupo de pacientes com malignidades (Neoplasias malignas, como o Mieloma Múltiplo ou Metástases ósseas) mais predisposto a apresentar ONM, com risco maior quando comparado com o grupo de pacientes que recebe a medicação devido à osteoporose. Outros fatores de risco importantes são a duração da terapia, a via de administração, associação com outras medicações e o subtipo de BPS. Sabe-se que o uso por longos períodos, a administração por via endovenosa, associação com uso prolongado de corticosteroides e a utilização do Ácido Zoledrônico estão associados ao maior risco para o desenvolvimento da ONM (BARON; FERRARI; RUSSELL, 2011; RUGGIERO et al., 2014, 2022).

2.2 DINÂMICA ÓSSEA E MARCADORES ÓSSEOS

Segundo Thomas e Martin (2008), o osso é um tecido conjuntivo especializado composto por substâncias orgânicas mineralizadas. Pierce et al., (2019) descreve o osso como um órgão endócrino complexo que atua na proteção dos órgãos vitais, no suporte estruturas do esqueleto e um papel imprescindível na hematopoiese e na hemostasia do cálcio, ou seja, o osso é classificado pelas suas funções metabólicas, mecânicas e protetoras. O osso ou tecido ósseo faz parte do esqueleto, sendo um órgão multifuncional que depende de uma constante renovação e manutenção do tecido ósseo, isso é possível devido à atividade contínua das células ósseas.

As principais atividades envolvidas no processo de remodelação são a formação óssea pelos osteoblastos e a reabsorção óssea realizada pelos osteoclastos, essas duas células efectoras são “comandadas” pelos osteócitos, que são osteoblastos maduros que ficaram presos na matriz óssea após o processo de mineralização (MARIE, 1992). Um grande número de citocinas, fatores de crescimento modificam a proliferação e a atividade das células ósseas e podem desempenhar um papel importante no equilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea. Essas atividades resultam na liberação de proteínas e metabólitos proteicos pelos osteoblastos e osteoclastos, que refletem diferentes aspectos do processo

dinâmico de remodelação óssea. Eles são, portanto, referidos como marcadores de remodelação óssea (TIAN et al., 2019).

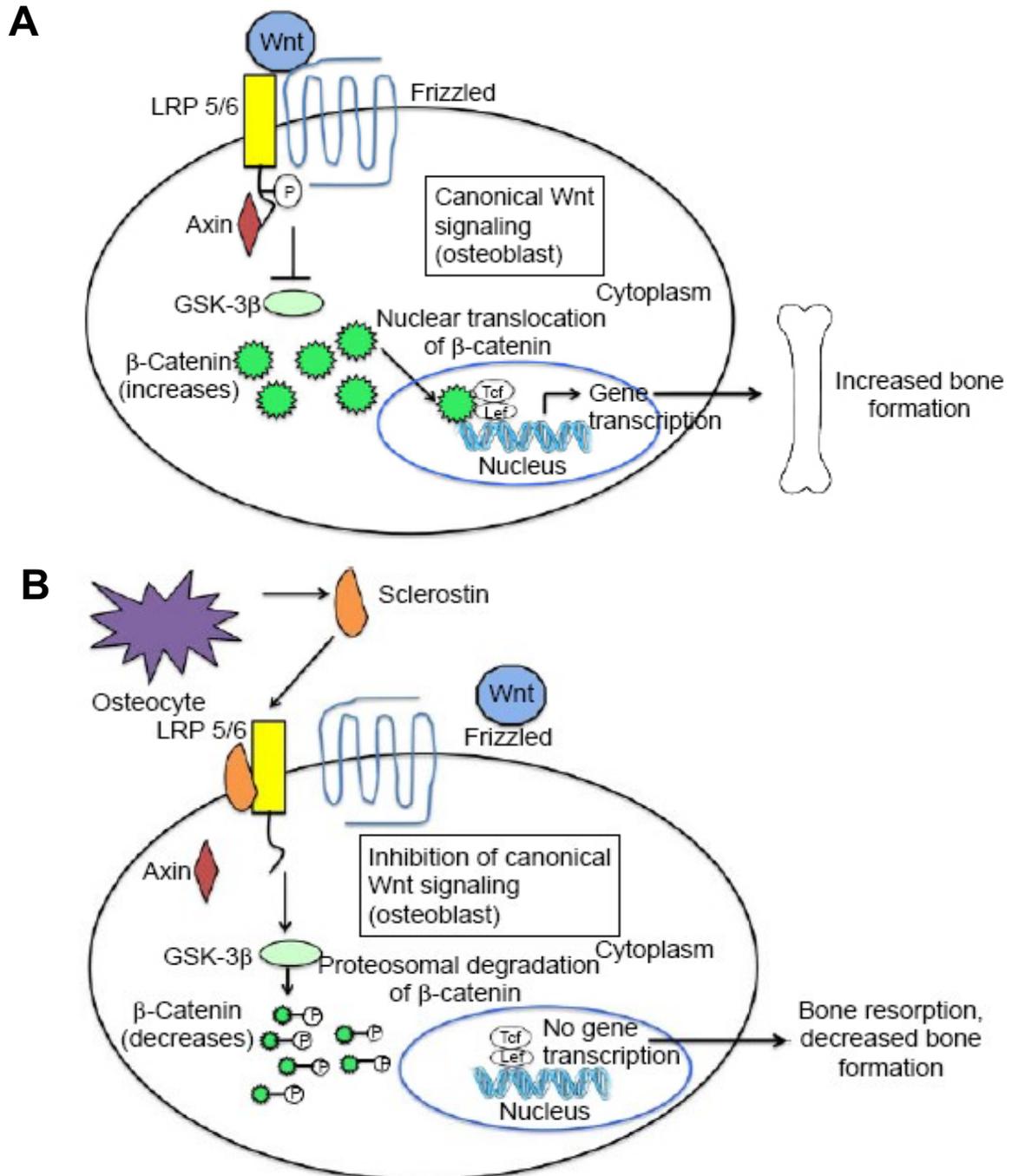
A Fosfatase Alcalina (FosfA) sérica é o mais conhecido marcador de formação óssea. A FosfA é uma enzima de membrana expressa pelos osteoblastos durante a mineralização da matriz osteóide e no indivíduo adulto normal, sabe-se que 50% da quantificação da enzima provém dos osteoblastos e 50% é produzida pelos hepatócitos. Apesar de ensaios específicos para a detecção apenas da fração óssea, esses ainda não são facilmente disponibilizados na prática clínica e podem também apresentar certa inespecificidade, uma vez que apresentam reatividade cruzada com níveis hepáticos em 20%. A sua medida no soro, pela detecção da molécula 7-nitrofenil fosfato, é o método mais disponível mundialmente, porém, indica a atividade enzimática total (MADEIRA, 2019). A faixa sérica normal de FosfA é de 20 a 140U/L. Em suma, a FosfA é um importante analito sérico e sua elevação no soro está correlacionada com a presença de doenças nos ossos e no fígado (SHARMA; PAL; PRASAD, 2014), e sua mensuração é utilizada como um importante marcador de remodelação óssea, mais precisamente de formação óssea. É uma enzima estável e não apresenta variações circadianas, porém seu uso diagnóstico deve ser empregado com cautela (MADEIRA, 2019).

Segundo Bellido (2014), em adultos, os osteócitos diferenciados e não proliferantes correspondem a cerca de 90% das células ósseas, sendo então a rede de intercomunicação destas células uma das principais responsáveis pela remodelação óssea. Assim o estudo em marcadores relacionados à regulação das atividades dos osteócitos pode ser útil clinicamente, tendo a aplicabilidade de seu uso como marcadores de diagnóstico, prognóstico ou monitoramento de doenças ósseas. Dincel e Jorgensen (2022) vão além, para eles, novos marcadores que refletem vias específicas na regulação óssea precisam ser explorados para ajudar a prever grupos de risco para doenças ósseas em estágios iniciais. Dentre estes marcadores, está a Esclerostina.

A Esclerostina é uma glicoproteína produto do gene SOST, localizado no cromossomo 17q21.31. Ela antagoniza a via Wnt canônica, também conhecida como via Wnt/ β -catenina, em osteoblastos, resultando na inibição da diferenciação osteoblástica e com conseqüente estimulação da apoptose dos mesmos. Com isso, a Esclerostina é conhecida como um potente inibidor da formação óssea (BARON; KNEISSEL, 2013).

De forma generalista, a via Wnt/ β -catenina desempenha um papel essencial na biologia dos osteoblastos, e é uma via de sinalização celular integrada através de vários componentes que incluem ligantes, receptores de membrana, efetores intracelulares e antagonistas. Na via Wnt/ β -catenina ativa, no osteoblasto, as proteínas Wnt se ligam ao correceptor proteína-5/6 relacionada a receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP5/6) do receptor Frizzled (FZD), existem diversas proteínas Wnt. Com a ativação do complexo FZD-LRP5/6-Wnt, há a fosforilação e migração da proteína *Dishevelled* (DSH) para a cauda do receptor FZD, levando a separação do “complexo de destruição” da β -catenina. O complexo de destruição é formado por proteína-esqueleto (AXIN2), caseína quinase 1 (CK1), polipose adenomatosa coli (APC) e glicogênio sintase quinase 3 (GSK3). Com isso, a β -catenina não é fosforilada pela GSK3 e se acumula no citoplasma celular. Após o acúmulo, há a translocação da β -catenina para o núcleo, onde ela associa-se a membros da família do fator de células T e família do fator de intensificação linfóide (TCF/LEF), ativando genes alvo-responsivos ao TCF, como a ciclina D1, OPG e c-myc. A OPG se liga ao RANKL como um receptor chamariz, impedindo assim a ligação do RANKL ao RANK. Na presença de ligação de RANKL a RANK, ocorre a ativação e diferenciação de osteoclastos. Assim, na presença de expressão aumentada de osteoprotegerina, há menor ligação de RANKL a RANK e, portanto, redução da osteoclastogênese e da reabsorção óssea, assim, ocorrendo aumento da formação óssea (Figura 4A).

Seguindo a mesma lógica, a ligação da Esclerostina ao LRP5/6 leva à prevenção da ligação FZD-LRP5/6-Wnt, inativando a via. Devido a isso, no citosol, a β -catenina é fosforilada pelo “complexo de destruição”. Assim, a β -catenina diminui no citoplasma celular e não consegue se translocar ao núcleo celular, onde faria seu papel na formação óssea e nas demais funções celulares (Figura 4B) (LIM; BOLSTER, 2017; MARINI et al., 2023).

Figura 4 – Via Wnt/ β -catenina ativa e inativa.

Fonte: Lim e Bolster (2017).

É preciso que as proteínas Wnt (ligantes Wnt) se liguem a receptores específicos para ativar a via Wnt/ β -catenina. Witte et al., (2009), na tentativa de compreender quais proteínas Wnt são expressas no osso, avaliaram a expressão de todos os ligantes Wnt durante o desenvolvimento ósseo dos membros de camundongos. Os dados obtidos foram que Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt7b, Wnt 10b,

Wnt16 e Wnt1 podem afetar a formação óssea osteoblástica ou o controle osteoblástico da osteoclastogênese através da OPG, nas vias canônicas e não canônicas. Nos osteoblastos, WNT3a e WNT10b estimulam a formação óssea ativando a via Wnt/ β -catenina (LERNER; OHLSSON, 2015).

Em relação à inibição da via Wnt/ β -catenina e voltando à Esclerostina, ela é uma glicoproteína que contém 213 aminoácidos e massa molar de 22kDa. Balemans et al., (2001; 2002), demonstraram em humanos, pela primeira vez, que mutações inativadoras do gene SOST, e conseqüentemente da expressão da Esclerostina, estão associadas a um aumento da densidade óssea na esclerosteose e na doença de Van Buchem (VBD, do inglês *Van Buchem Disease*), doenças que causa uma hiperostose generalizada. A primeira detecção da Esclerostina em osteócitos adultos humanos ocorreu por Winkler et al., (2003), através da marcação imunohistoquímica (IHQ). Neste estudo, os pesquisadores encontraram forte marcação positiva em osteócitos, canalículos osteocíticos, condrócitos e fraca marcação em outras células osteoblásticas. Com isso, os pesquisadores demonstraram um padrão em que a expressão de SOST está associada a células osteogênicas.

Corroborando com a hipótese anterior, Van Bezooijen et al., (2009) analisaram em seu estudo, usando IHQ, se o defeito genômico em indivíduos com VBD estava associado à ausência de expressão de Esclerostina e se isso estava associado à hiper cementose. Eles demonstraram que a Esclerostina é expressa por todos os 3 tipos de células diferenciadas terminalmente incorporadas em matrizes mineralizadas: osteócitos, cementócitos e condrócitos hipertróficos. Além disso, Winkler et al., (2003) demonstra que a Esclerostina age como importante antagonista das BMP. Eles propõem que a Esclerostina liberada dos osteócitos poderia controlar a proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras/pré-osteoblásticas, bem como a atividade de osteoblastos maduros por meio da regulação negativa da atividade de BMP.

Outro ponto importante que surgiu de estudos recentes é que a Esclerostina provavelmente funciona como um regulador local/parácrino do metabolismo ósseo, e não como um hormônio endócrino. Corroborando para a hipótese de que os níveis circulantes de Esclerostina podem refletir a mudanças locais, ou seja, a Esclerostina age localmente, mas os níveis circulantes podem refletir alterações no osso (DRAKE; KHOSLA, 2017). A Esclerostina já vem sendo estudada como biomarcador sérico de algumas condições como doença renal crônica e distúrbio mineral ósseo,

bem como alterações esqueléticas e vasculares (PELLETIER; JEAN; FOUQUE, 2015). Porém, ainda não há na literatura estudos associando os níveis de Esclerostina local com as necroses ósseas ativas dos maxilares.

A osteoporose é uma doença osteometabólica em que a Esclerostina vem sendo bem estudada e já é considerada como um biomarcador. Gorter et al., (2022) analisaram a Esclerostina sérica por um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e a densidade mineral óssea (DMO) por densitometria óssea (DO) em 179 pacientes com 181 fraturas ósseas. Desses 179 pacientes, 46 pacientes tinham o diagnóstico de osteoporose. Os pesquisadores concluíram que a DMO em pacientes com fratura de extremidade foi positivamente associada aos níveis de Esclerostina e os pacientes com fratura osteoporótica apresentaram níveis significativamente mais baixos de Esclerostina em comparação com pacientes com fratura não osteoporótica.

Em seu estudo, Kuroda et al., (2022) avaliaram a Esclerostina sérica por ELISA e outros parâmetros como cálcio, fosfato e PTH em 24 pacientes do sexo feminino com osteoporose pós-menopausa primária. Doze delas receberam uma dose única de ácido zoledrônico (ZA) 4 mg e as demais receberam a posologia de 5 mg. Amostras de soro foram coletadas nos dias 15, 29, 90, 180 e 365 após a administração. Os pesquisadores demonstraram que os níveis de Esclerostina sérica permaneceram inalterados nos dois primeiros tempos de coleta (15 e 29), mas aumentaram significativamente no dia 90, diminuíram significativamente no dia 180 e retornaram aos níveis basais no dia 365, e, também observaram uma correlação negativa significativa dos níveis de Esclerostina com os níveis de PTH. Assim, concluíram que a injeção anual ZA inicialmente aumentou e posteriormente diminuiu a Esclerostina sérica por meio de alterações nos níveis de PTH.

Inagaki et al., (2016) avaliaram a expressão da Esclerostina em tumores ósseos e lesões tumorais ósseas através da IHQ e reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa. Foram observadas marcação IHQ de Esclerostina em tecido ósseo de displasia fibrosa, displasia osteofibrosa, em osso reativo formado em calo de fratura, marcação na parede de cistos ósseos solitários e cistos ósseos aneurismáticos. A Esclerostina foi expressa por condrócitos hipertróficos no osteocondroma e condroblastos no condroblastoma, mas não por células tumorais em outros tumores ósseos, incluindo mieloma e carcinoma metastático. A expressão

de mRNA de Esclerostina foi identificada por PCR quantitativo em espécimes de osteossarcoma e suas linhagens celulares.

Embora a Esclerostina tenha sido amplamente vista como uma proteína específica dos osteócitos e os níveis circulantes de Esclerostina em humanos geralmente refletiriam em mudanças no microambiente ósseo, estudos recentes mostraram que vários tipos de células adicionais expressam SOST e são capazes de produzir a proteína Esclerostina, como osteoblastos, hepatócitos e células musculares lisas vasculares. Além disso, a Esclerostina sérica tende a aumentar com a idade, e várias variáveis foram identificadas como determinantes dos níveis séricos de Esclerostina, incluindo idade, hormônio da paratireoide, estradiol e hormônio folículo-estimulante para mulheres na pré-menopausa (WEIVODA; YOUSSEF; OURSLER, 2017).

O estrogênio suprime os níveis de mRNA de Esclerostina circulante e óssea em humanos e o PTH também suprime os níveis de Esclerostina (DRAKE; KHOSLA, 2017). A função renal também afeta os níveis séricos de Esclerostina, e os pacientes com doença renal crônica (DRC) apresentaram níveis de Esclerostina mais altos do que os indivíduos de controle, com valores progressivamente mais altos nos estágios da DRC (PELLETIER; JEAN; FOUQUE, 2015).

Devido a essas características de reguladora osteogênica negativa, a Esclerostina já é alvo de bloqueio em medicação. O Romosozumab é um anticorpo monoclonal anti-Esclerostina com dupla função de aumentar a formação óssea e reduzir a reabsorção óssea, e vem sendo utilizado no tratamento da osteoporose grave em mulheres pós menopausa (KAVEH et al., 2020). O Romosozumabe foi liberado pela ANVISA para o uso no Brasil em 2021, seu nome comercial é Evenity®, com posologia de 105mg/1.17mL, administrado por via subcutânea (SINGH et al., 2022).

Em ensaios clínicos, o anticorpo anti-Esclerostina (Romosozumabe, Amgen Inc., UCB Bruxelas) aumenta a formação óssea e reduz o risco de fraturas osteoporóticas. No entanto, em conjunto com o aumento da atividade osteoblástica, observa-se uma redução nos marcadores de reabsorção óssea (SINGH et al., 2022). Este efeito antirreabsortivo levanta a preocupação de um possível desenvolvimento de ONM em pacientes tratados com anticorpos anti-Esclerostina. Muito se especula sobre o possível papel do anti-Esclerostina no aparecimento de casos de ONM, já

existem relatos na literatura associando a ONM com o uso do Romosozumabe, mas a medicação nunca de forma isolada (COSMAN, CRITTENDEN, GRAUER 2017).

Hadaya et al., (2019) avaliaram os efeitos da inibição da Esclerostina no desenvolvimento de ONM em ratas ovariectomizadas com periodontite experimental induzida. Foram comparados três grupos, o primeiro recebeu injeções de veículo controle, o segundo ZA 200µg/kg e o terceiro anti-Esclerostina 5mg/kg. Os pesquisadores constataram que os ratos do terceiro grupo não apresentaram sinais histológicos de ONM, apresentaram aumento nos parâmetros estruturais ósseos e perderam menos osso periodontal em locais com PE. Já os ratos tratados com ZA desenvolveram características histológicas de ONM.

2.3 ÍNDICES RADIOGRÁFICOS NÃO CONVENCIONAIS: ANÁLISE FRACTAL E LACUNARIDADE

As radiografias dentárias são de baixo custo e frequentemente realizadas durante exames odontológicos regulares e check-ups em uma ampla população. Elas oferecem uma oportunidade para observar a composição e a condição do osso maxilar ao longo de um período prolongado, com exposição ou risco mínimo. Os parâmetros clássicos para análise radiográfica são amplamente empregados e fazem parte do processo diagnóstico de várias doenças ósseas, como osteorradionecrose e osteonecrose medicamentosa dos maxilares (KLINGELHÖFFER et al., 2016; ŞAHIN et al., 2019).

Para além da análise qualitativa e quantitativa convencional dos exames imaginológicos, outros parâmetros podem ser analisados nas imagens obtidas por meio do uso dos Raios X. Em termos de pesquisas clínicas e experimentais, sabe-se que se pode lançar mão também do uso de parâmetros não convencionais, incluindo a análise de textura. Dentro desta análise, um parâmetro útil para análise de imagens radiográficas é a análise fractal (AF), um método matemático que descreve e analisa formas complexas e irregulares dos padrões estruturais por meio da matemática não-Euclidiana. Essa avaliação pode ser empregada em diversas imagens das estruturas biológicas, incluindo a análise óssea. Especificamente, a dimensão fractal é o resultado quantitativo da AF, que corresponde a um tipo de avaliação da complexidade da estrutura demonstrada na imagem. Os verdadeiros fractais são estruturas que demonstram padrões repetidos em escalas infinitas, ou

seja, um objeto é definido como um fractal se apresenta invariância de forma quando a escala varia, revelando uma complexidade infinita. Quando ampliamos uma imagem com N estruturas, podemos observar mais detalhes, mas o número de estruturas permanece o mesmo. Para medir a complexidade dessas estruturas, é necessário contar o número de peças em uma escala específica (CROSS, 1997).

A fórmula FD é usada para calcular a complexidade, levando em conta o número de peças e a escala de ampliação. Matematicamente, é expressa como $D = \log n / \log \epsilon$, onde N é o número de peças e ϵ é a escala definida (CROSS, 1997). Ou seja, a análise da FD na avaliação óssea usa um algoritmo de contagem de caixa (*box counting*) para avaliar a distribuição espacial do osso trabecular, contando a medula óssea e a interface do osso trabecular, ou seja, diversas grades (ou caixas) são sobrepostas à imagem, com diferentes tamanhos, e a partir disso conta-se quantas estão preenchidas por osso e assim pode-se o osso trabecular e sua distribuição em relação aos espaços medulares. Um valor de contagem de caixa mais alto está associado a uma estrutura óssea mais complexa. O cálculo da FD pode ser feito por meio de softwares gratuitos através de tratamento e processamento de imagens, como o *software Image J* (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) (CROSS, 1997; WHITE; RUDOLPH, 1999). A FD analisada juntamente com demais índices convencionais pode indicar os primeiros sinais de alterações no osso alveolar decorrentes da ORN (KLINGELHÖFFER et al., 2016; ŞAHIN et al., 2019; TORRES et al., 2011).

Ainda é insuficiente o número de estudos científicos que abordam de forma padronizada a aplicação da FD em imagens radiográficas, especialmente aquelas relacionadas à odontologia. Na área da medicina há uma ampla utilização da FD na tentativa de identificar associações destes valores na análise conjunta da DMO. Na odontologia, a análise da FD é empregada em radiografias panorâmicas, periapicais, interproximais, cefalométricas, tomografias computadorizadas de feixe cônico e também em exames menos comuns nessa área, como a microtomografia (Micro-CT), ultrassonografia e sialografia (FRANCIOTTI et al., 2021; KATO et al., 2020). A técnica de Micro-CT é considerada o padrão-ouro para avaliar a morfologia óssea, permitindo aos profissionais uma análise minuciosa das estruturas em escala micrométrica, porém não é uma técnica com indicações na rotina clínica, e sim, utilizada em pesquisas científicas (IRIE et al., 2018).

Devido a isso, as radiografias panorâmicas e as periapicais são as mais utilizadas, uma vez que podem ser acessadas com facilidade, em estudos prospectivos e retrospectivos, e assim, estes exames de imagem permitem uma avaliação qualitativa em conjunto com avaliação de parâmetros convencionais aliados a análise da FD. Quanto à técnica de realização, a maioria dos estudos (cerca de 70%) que realiza a AF em radiografias odontológicas segue a metodologia proposta por White e Rudolph (1999) (FRANCIOTTI et al., 2021). Esta metodologia foi desenvolvida para avaliar arquitetura trabecular óssea em indivíduos saudáveis e osteoporóticos através de radiografias periapicais analógicas, que foram posteriormente digitalizadas. Os autores criaram um passo a passo para tratamento de imagem que culminavam com a obtenção final de uma estrutura esqueletonizada, ou seja, as trabéculas ósseas eram traduzidas a uma estrutura linear em uma imagem binária, e a partir disso, era calculada a FD.

Em estudos recentes, que relatavam a necessidade de padronização, focavam na necessidade de se padronizar o método de calcular a FD. No entanto, também se evidenciou a necessidade de padronizar o processamento das imagens. Dessa forma, parte da equipe deste projeto de pesquisa realizou um estudo em radiografias digitais para revisão do método de processamento e também, sugerir um método alternativo, sem a necessidade de binarização. Este estudo de da Silva et al., (2023) reportou a possibilidade da avaliação da estrutura óssea trabecular através da FD com um método de White e Rudolph revisado, este então propondo a remoção de estruturas não-relacionadas às trabéculas, na imagem binarizada. Ainda, propuseram a utilização de um método baseado no uso das imagens diretamente em escala de cinza, utilizando o plugin *FracLac* (KARPERIEN, 2007-2012). Os autores concluíram que a versão revisada do método original de White e Rudolph foi capaz de identificar a estrutura esqueletonizada correspondente às trabéculas ósseas de forma mais acurada do que o método original. Também, revelou excelente concordância com o método revisado e àquele baseado no uso das imagens diretamente em escala de cinza, além de exibir correlação positiva significativa nos valores FD obtidas nos dois métodos, e sugerem o uso do método de escala de cinza por ser um método de processamento que consome menos tempo.

Em suma, o método baseado em escala de cinza, utilizado no estudo citado anteriormente, não tem a necessidade de binarização e também utiliza o método de

contagem de caixas. Esse método pelo plugin *FracLac* parte do princípio que as imagens em escala de cinza existem em um espaço pseudo-3D, onde todo pixel é significativo para o cálculo final. Além do cálculo do FD, o *FracLac* também permite a medição da lacunaridade (Lac), uma propriedade baseada na distribuição e disposição das lacunas ou buracos na estrutura analisada. Na análise de imagens, a lacunaridade diminui quando a distribuição de lacunas tende a ser mais regular. De forma resumida, a Lac pode ser considerada um complemento da FD, e está relacionada com a distribuição e o tamanho dos espaços vazios presentes na imagem (para o osso, em radiográficas, seriam os espaços medulares correspondentes às áreas mais radiolúcidas), assim, se um fractal tem grandes espaços vazios, apresenta uma Lac com valores mais altos, enquanto que, se o fractal apresenta pequenos espaços vazios ou estes estão distribuídos de forma mais homogênea, tem Lac com valores mais baixos (CAMBRAIA FARIA et al., 2021; SANTOS et al., 2023).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Entender o papel da Esclerostina como possível marcador em pacientes diagnosticados com osteonecrose medicamentosa e osteorradionecrose, e ainda, identificar se existe relação com achados clínico-demográficos, bioquímicos e imaginológicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar os níveis séricos dos biomarcadores Esclerostina e FosfA em pacientes com ON e comparar com pacientes sem necroses ósseas dos maxilares e/ou doenças osteometabólicas.
- 2) Avaliar parâmetros radiográficos convencionais e não-convencionais, incluindo dimensão fractal e lacunaridade, em radiografias panorâmicas de pacientes com ON, em regiões distintas: no sítio lesional e em áreas sem lesão evidente.
- 3) Comparar parâmetros radiográficos nas áreas lesional e sem lesão de forma pareada.
- 4) Identificar possíveis correlações e associações entre os achados séricos e os dados clínico-demográficos e imaginológicos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi caracterizado como estudo prospectivo com a seleção de pacientes diagnosticados com lesões ativas de osteonecroses maxilares (ORN e/ou ONM), atendidos no Núcleo de Odontologia Hospitalar do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC/EBSERH e no Serviço de Cirurgia bucomaxilofacial do Hospital Erasto Gaertner, entre os anos de 2022 e 2023. Ademais, pacientes sem osteonecroses nos ossos maxilares foram selecionados no laboratório de análises clínicas (ULAC) do HU/UFSC/EBSERH para compor o grupo controle comparativo da análise sérica exclusivamente. Este projeto foi submetido para apreciação do Comitê de Ética em pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Santa Catarina e Hospital Erasto Gaertner, e foi aprovado sob os números: 5.509.662 (CAAE: 54374221.3.0000.0121) e 5.781.569 (CAAE: 54374221.3.3001.0098), respectivamente. Trata-se de um estudo prospectivo, transversal, analítico e quantitativo.

4.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos pacientes com idade maior ou igual a 18 anos, com diagnóstico de: a) ONM, que utilizam e utilizaram drogas que alteram o metabolismo ósseo (Bisfosfonatos ou Denosumabe, podendo estar associado com uso de outras terapia-alvo) pelo menos nos últimos 6 meses, e que apresentam qualquer estágio de classificação das necroses na região maxilofacial que persistiram por mais de 8 semanas; b) ORN, que receberam radiação ionizante na região dos maxilares há mais de 3 meses e apresentaram qualquer estágio de classificação das necroses na região maxilofacial, com persistência por mais de 3 meses. Para o grupo controle, foram incluídos pacientes saudáveis, sem ON dos maxilares, maiores de 35 anos, que estavam realizando exames laboratoriais de rotina no ULAC.

Foram excluídos deste estudo os pacientes em uso corticosteroides sistêmicos por mais de três meses de forma contínua, com presença de metástases ou outras neoplasias benignas ou malignas nos ossos maxilares, além de pacientes com outras doenças osteometabólicas, insuficiência hepática, e pacientes em condições clínicas ou comprometimento do estado geral de saúde que os impediram

de participar do estudo. No grupo controle, foram excluídos pacientes com comorbidades hepáticas, renais, osteometabólicas e diabetes.

4.2 COLETA DE DADOS

Todos os pacientes participantes que foram convidados a participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A). No grupo de pacientes com ON, além da avaliação clínica minuciosa, foram coletadas amostras de sangue para avaliação de biomarcadores, e dentro da mesma semana, foram realizadas radiografias panorâmicas. Reitera-se que a realização das radiografias panorâmicas e a solicitação de marcadores séricos e outros exames laboratoriais são pedidos como exames de rotina para estes pacientes, no decorrer do tratamento, de forma a avaliar a evolução das lesões e efetividade dos tratamentos instituídos para cada paciente, como parte dos protocolos de conduta do NOH/HU/UFSC.

Os demais dados referentes a cada etiologia da osteonecrose foram coletados do prontuário do paciente. No caso das ONM, as informações referentes à dose, posologia e tempo de uso foram coletadas. Já em casos de ORN os dados da dose de radiação em Gy, tempo do término da radioterapia e área irradiada foram coletados. Em todos os casos, foram coletados dados clínicos, demográficos e demais características. As necroses foram classificadas clinicamente de acordo com seus estágios descritos nos quadros 1 e 2. No grupo de pacientes sem osteonecrose dos maxilares (controle), além da alíquota de sangue para a análise de biomarcadores, foram coletados dados demográficos como idade, sexo, medicações em uso e comorbidades.

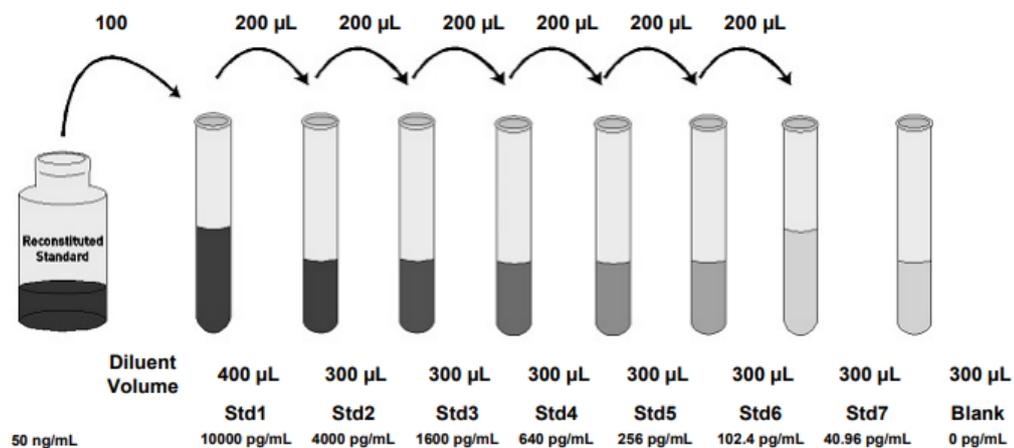
4.3 ANÁLISE SÉRICA DA ESCLEROSTINA E FOSFATASE ALCALINA

Para a coleta de sangue o paciente necessitou estar em jejum de quatro horas. O sangue foi coletado e armazenado em um tubo de coleta com gel separador e ativador de coágulo, este ativador de coágulo (sílica) é jateado na parede do tubo, fazendo com que o processo de coagulação da amostra seja acelerado. Então, o Sangue foi centrifugado para obtenção do soro e do plasma. O soro foi armazenado, em temperatura -20°C, separadamente em tubo eppendorf.

A concentração de Esclerostina sérica foi avaliada através de um ensaio imunoenzimático comercial sanduíche (*Human Sclerostin (SOST) solid-phase sandwich ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)*, LOTE 373031423). Resumidamente, o soro teste foi colocado em microplacas pré-revestidas com anticorpos de Esclerostina em duplicata. No teste ELISA tipo sanduíche o anticorpo é fixado aos poços da placa, a amostra é então adicionada e em seguida são inseridos os anticorpos conjugados. Desta forma, se houvesse antígeno presente na amostra, o anticorpo de detecção permaneceria no poço após a lavagem da placa, e a enzima reagiria com o substrato.

Foi preparada a solução padrão com concentração de 50 ng/mL (*Reconstituted Standard*), adicionando 400 µl de diluente de ensaio ao frasco de Esclerostina Humana liofilizada. Para a obtenção das soluções padrões (std1, std2, std3, std4, std5, std6 e std7), foi adicionado 100 µl de Esclerostina Humanada em um tubo com 400 µl de diluente de ensaio para preparar uma solução padrão std1 de 10.000 pg/mL. Nos demais 7 tubos, foi pipetado 300 µl de diluente de ensaio em cada tubo. A solução padrão de 10.000 pg/mL foi utilizada para produzir uma série de diluição (Figura 5). O diluente de ensaio serviu como padrão zero (*Blank*) (0 pg/mL).

Figura 5 – Diluição seriada das soluções padrões.

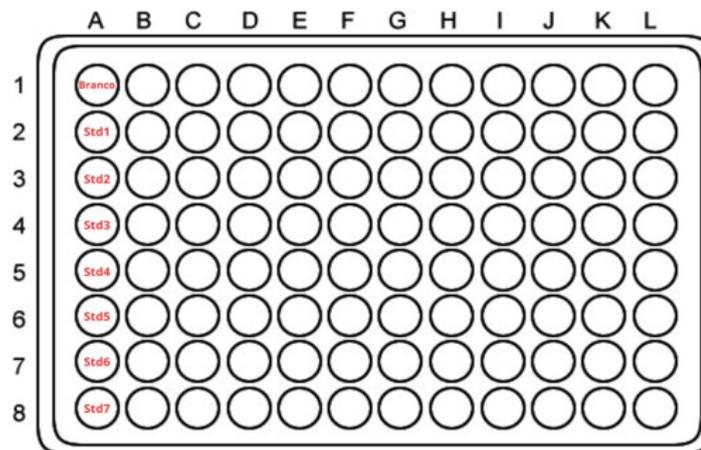


Fonte: Bula do Ensaio (*Product datasheet*, ThermoFisher SCIENTIFIC).

As amostras de soro foram diluídas em tubo de ensaio de vidro, conforme orientações do fabricante, em uma proporção 1:2, onde foram adicionadas 200 µl de

soro e 200 μl de diluente de ensaio, totalizando 400 μl . A placa com 96 poços continha o Anticorpo Esclerostina de captura, ou seja, àquele incorporado nas paredes dos poços. Para a curva padrão, foi adicionado 100 μl de cada solução padrão aos poços apropriados (Figura 6). Nos demais poços correspondentes a cada amostra foram adicionados 100 μl de cada amostra diluída. Após o preenchimento da placa, ocorreu a incubação desta, durante a noite (período aproximado de 14 horas), a 4°C, sob agitação suave.

Figura 6 – Distribuição das soluções padrões na Placa de Elisa 96 poços, para obtenção da curva padrão.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a incubação, a placa foi colocada em uma lavadora de microplacas (*Microplate Washer DRW-310, Diatek, China*). A solução foi aspirada e a placa lavada automaticamente em 4 ciclos com 300 μl de solução de lavagem (Wash Buffer) em cada poço. Com a placa lavada, 100 μl do conjugado de biotina foi adicionado em cada poço. A placa foi incubada por 1 hora em temperatura ambiente com agitação suave. Após a incubação, a lavagem da placa foi repetida conforme descrito anteriormente. Então, 100 μl de solução de estreptavidina-HRP preparada foi adicionada a cada poço e incubada por 45 minutos em temperatura ambiente com agitação suave. Novamente a placa foi lavada como anteriormente. Então, 100 μL de TMB (*3,3', 5,5"-tetramethylbenzidine*) foi adicionado a cada poço, o substrato começou a ficar azul e foi incubado por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro com agitação suave. Por fim, 50 μl de solução de parada de reação em cada

poço. A solução no poço muda da cor azul para a cor amarela e a absorvância dos poços foi lida com filtro de 450nm em uma leitora de placa (MR-96A, Mindray, Brasil).

Os dados de absorvância foram tabulados no Microsoft Excel e utilizados para construir uma curva padrão. Essa curva foi gerada através da criação de um gráfico de dispersão com as absorvâncias no eixo Y e as concentrações no eixo X. Uma linha de tendência adequada foi adicionada ao gráfico, e o Excel calculou automaticamente a equação correspondente à curva padrão, que foi $Y = 3721x$. Além disso, o coeficiente de determinação (R^2) obtido foi de 0,8799, indicando um bom ajuste da curva aos dados experimentais. Essa curva e seu valor de R^2 contribuem para a precisão e confiabilidade das estimativas de concentrações desconhecidas com base nas absorvâncias medidas nas amostras de interesse.

A FosfA sérica foi obtida pelo método colorimétrico (método PNPP-AMP-Tampão) de forma automática no sistema de bioquímica integrada *Dimension® EXL 200™* (Siemens, Munich, Germany), como procedimento de rotina do laboratório de análises clínicas. Todo o processo laboratorial foi realizado na Unidade de Laboratório de Análises Clínicas – ULAC no HU/UFSC/EBSERH.

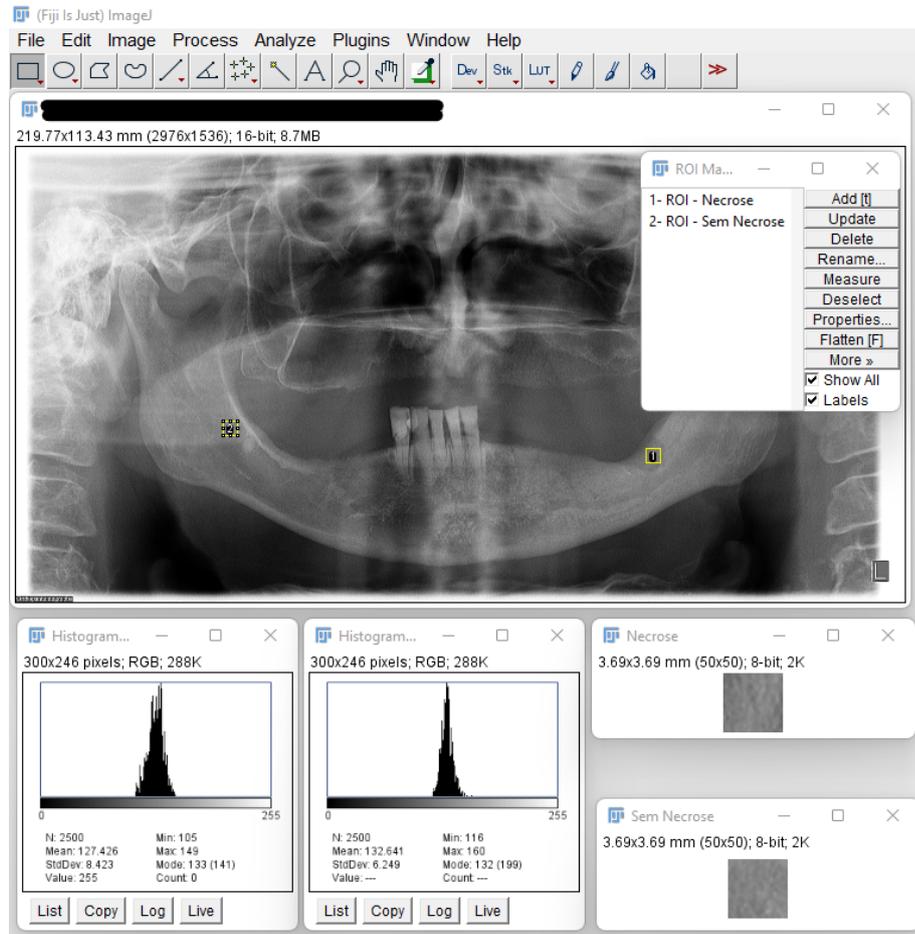
4.4 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE RADIOGRAFIAS

A radiografia panorâmica foi realizada pelo conjunto de aparelho ORTHOPANTOMOGRAPH™ OP200 D (Instrumentarium Dental, Tuusula - Finlândia) e computador associado, disponibilizado no NOH HU/UFSC/EBSERH e no Hospital Erasto Gaertner. Foram realizadas análises qualitativas (em arquivos em qualquer formato) e quantitativa (apenas nos arquivos em formato DICOM). Na análise qualitativa, as imagens digitais foram avaliadas por três operadores (a própria autora, o orientador e uma especialista em radiologia) conforme a presença de características radiográficas como: osteólise, osteosclerose, tecido ósseo denso, espessamento da lâmina dura e/ou aumento do espaço do ligamento periodontal, alterações periapicais, todas estas características analisadas na região da lesão de necrose. Para pacientes com mais que um sítio lesional, todos os sítios foram avaliados. Esta análise qualitativa propiciou a melhor identificação dos sítios lesionais para a posterior análise quantitativa.

Na análise quantitativa, foi realizada análise dos tons de cinza (média e desvio-padrão dos tons ou níveis de cinza na imagem, Cinza_m, Cinza_DP, respectivamente) na imagem, juntamente com a análise da FD e Lac com auxílio do software *ImageJ* (1.53, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). O cálculo da FD foi baseado no método de *box-counting*. As regiões de interesse (ROI) foram escolhidas com base nos trabalhos prévios do coordenador desta pesquisa, em duas regiões dentistas: no sítio lesional e em um sítio sem a presença de lesão, para fins comparativos. A análise dos parâmetros foi realizada usando o método de pré-processamento que se baseia no uso apenas de imagens em escala de cinza, sem necessidade de binarização, de acordo com o estudo de Da Silva et al., (2023). As ROIs foram escolhidas por uma operadora treinada com dois anos de experiência em análise de imagem, e o Índice de Confiabilidade Intraclasse (ICC) para a concordância intraexaminador foi calculada, para medir a concordância entre as duas análises realizadas por um mesmo operador em um intervalo de 10 dias, para 10 imagens. O cálculo do ICC foi calculado para os seguintes parâmetros: FD e Lac, média e desvio-padrão dos tons de cinza e para as coordenadas nos eixos X e Y de localização da ROI na imagem.

Áreas com estruturas anatômicas, artefatos radiográficos e raízes dentárias foram evitadas, respeitando-se a distância mínima de 1,5 mm para a escolha da área a ser segmentada. Em cada radiografia, uma ROI foi selecionada para cada lesão de necrose óssea (N) e uma ROI em osso comparativo sem lesão (SL). Por exemplo, se o paciente apresentava duas áreas de necrose óssea, três ROIs foram escolhidas. ROI 1: Na lesão de necrose 1, ROI 2: Na lesão de necrose 2, ROI 3: Osso trabecular comparativo do lado contralateral à lesão, no mesmo maxilar. Todas as ROIs tinham uma forma quadrada, com tamanho de 50 × 50 pixels, e todas foram convertidas para 8 bits (Figura 7).

Figura 7 – Seleção das ROIs (N e SL) e dados do Histograma



Fonte: Elaborado pelo autor.

O histograma foi avaliado em cada ROI por meio do comando *Ctrl+H* do *software*, que forneceu a observação gráfica do histograma, bem como os dados da Média do nível de cinza (a soma dos níveis de cinza de todos os pixels na seleção dividida pelo número total de pixels na ROI) e o Desvio padrão do nível de cinza (Figura 8). As ROIs foram duplicadas para análise da FD. A FD foi realizada pelo método sem binarização e esqueletonização, baseado no uso das imagens em escala de cinza, utilizando o *plugin* *FracLac*. O método de contagem de caixas foi escolhido dentro do *plugin*, e a opção “*Gray1: Differential*” foi selecionada. No desenho da grade, o número de posições da grade foi definido como 9. A análise de blocos não foi realizada. Todas as imagens foram escaneadas utilizando a função “*Batch*” com esta configuração, obtendo-se os valores de FD e Lac (DA SILVA et al., 2023).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar a confiabilidade intra-examinadora das análises realizadas, utilizou-se o ICC com o objetivo de medir a concordância entre as duas análises realizadas por um mesmo operador em um intervalo de 10 dias, para 10 imagens. Além do ICC, também foram calculados os intervalos de confiança a 95% para fornecer uma estimativa da precisão do ICC. Os resultados do ICC foram interpretados de acordo com a escala proposta por Landis e Koch (1977) em que valores de ICC abaixo de 0,40 indicam uma concordância fraca, valores entre 0,40 e 0,60 indicam uma concordância razoável, entre 0,60 e 0,75 indicam uma concordância boa e valores acima de 0,75 indicam uma concordância excelente.

Foi realizada análise descritiva dos dados e avaliação da distribuição dos mesmos. O teste de Shapiro-Wilk foi realizado, revelando normalidade para as variáveis: idade, FosfA, Cinza_m, FD e Lac. A distribuição foi não-normal para as variáveis dose em Gy e níveis de Esclerostina. Posteriormente a análise descritiva, houve necessidade de identificação de outliers para a Esclerostina no grupo controle, que foi averiguado pelo teste de ROUT, sendo identificado um paciente (com valor de 4854 pg/ml), que teve seus dados removidos para este parâmetro.

Para o teste de correlação, foram calculadas médias para os pacientes que tinham mais de um sítio lesional em relação aos parâmetros radiográficos quantitativos. Foi realizado a correlação de Spearman entre as variáveis idade, dose de radiação (Gy), Fosfatase Alcalina (FosfA), Cinza_m, Cinza_DP, FD, Lac e Esclerostina para o grupo ON. Para o grupo controle, foi realizada também a correlação de Spearman para os parâmetros de idade, FosfA e Esclerostina. A magnitude da correlação foi considerada pelo valor de **R** quando: o valor fosse igual ou maior que 0,9 como uma correlação muito forte, quando valor era de 0,7 a 0,89 era forte, quando o valor ficava entre 0,4 a 0,69, era moderada e quando apresentava um valor abaixo de 0,39 indicava uma correlação fraca.

Para a análise comparativa, os parâmetros de idade e FosfA foram comparados entre ON e C, usando os testes T não pareado. Para a Esclerostina, o teste utilizado foi de Mann-Whitney. Na análise quantitativa dos parâmetros radiográficos, foram comparados os grupos de sítios sem lesão (SL) contra o sítio lesional de necrose (N), utilizando o teste T para as variáveis FD e Cinza_m, e o teste de Mann-Whitney para as variáveis Cinza_DP e Lac. A análise multivariada de

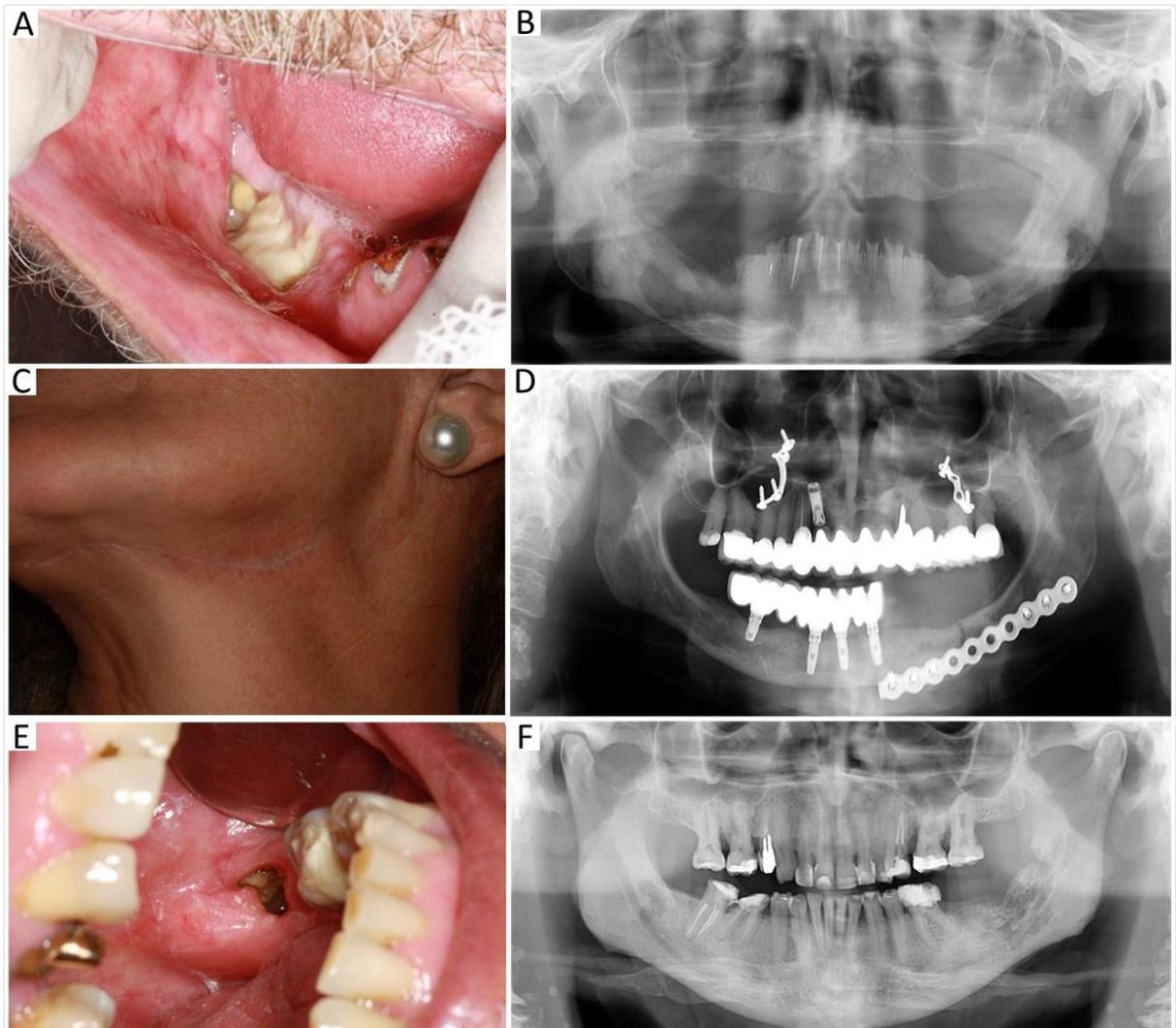
fatores foi realizada para ORN, sendo a Esclerostina e FosfA variáveis dependentes e os parâmetros cruzados foram etiologia (ORN/ONM), ON após exodontia, número de sítios, localização e estágios.

5 RESULTADOS

A amostra foi composta por 27 pacientes com ON, sendo 8 pacientes apresentando ONM (feminino: 6, masculino: 2) e 19 apresentando ORN (feminino: 2, masculino: 17). Dos 19 pacientes com ORN, a média da dose recebida em Gy foi de 69,6. Dos oito pacientes com ONM, dois pacientes utilizaram DMAB, dois utilizaram Ácido Zoledrônico, três utilizaram Alendronato de Sódio e um utilizou Dasatinibe. No universo de 27 pacientes, houve 30 sítios de ON, sendo três pacientes diagnosticados com dois sítios lesionais. A mandíbula foi osso mais acometido, representando 86,66 % dos casos, sendo 21 em região posterior e 5 na anterior. Todos os pacientes apresentavam lesões ativas, sendo alguns deles já em curso de tratamento no momento da coleta, apenas com terapias adjuvantes (laserterapia, ozonioterapia e antibioticoterapia), porém nenhum deles ainda submetido a algum tratamento cirúrgico.

A análise clínica revelou somente um caso classificado como estágio zero, em que havia ausência da exposição óssea, porém alterações radiográficas e clínicas estavam presentes, com episódios prévios de edema facial na área, alterações trabeculares e presença de osteosclerose no exame radiográfico. Quatro pacientes foram classificados como estágio um e dezesseis como estágio dois, assim, a diferença entre o estágio um para o dois, foi a presença de infecção e envolvimento de tecidos moles no estágio dois. Sendo o estágio dois o mais encontrado, correspondendo a 59,25% dos casos. Por fim, o estágio 3, considerado o mais grave, foi encontrado em seis pacientes desta amostra (Figura 8).

Figura 8 – Características clínicas e radiográficas das ON



Legenda: A: ORN, exposição óssea em corpo de mandíbula a direita com infecção associada e tecidos moles adjacentes envolvidos. B: Radiografia panorâmica do caso descrito em A. Osteólise e alteração arquitetural do trabeculado ósseo difuso em corpo de mandíbula bilateral, com envolvimento medular e afinamento de basilar da mandíbula lado direito, paciente sob risco grave de fratura patológica. C: Cicatriz cirúrgica extraoral após osteossíntese de fratura patológica em corpo de mandíbula a esquerda devido a uma ONM. D: Radiografia panorâmica do caso descrito em C. Placa de fixação alocada, podemos observar ausência da consolidação da fratura. E: Exposição óssea em região de trígono retromolar lado esquerdo. F: Radiografia panorâmica do caso descrito em E.

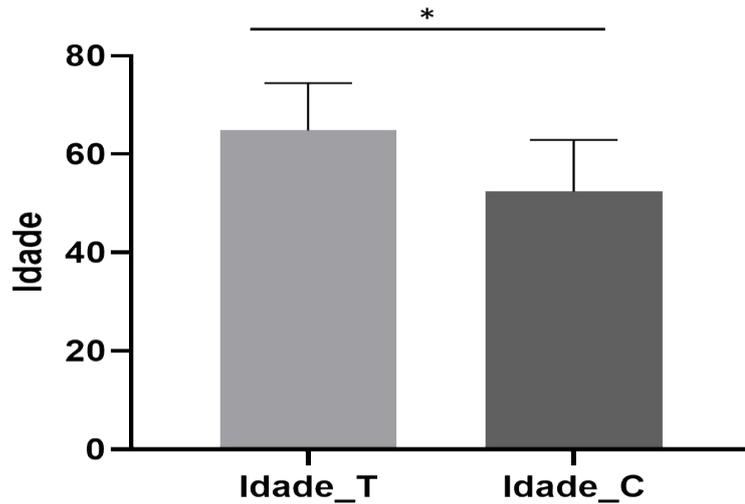
Alteração de trabécula ósseo associado à osteólise e formações de sequestros ósseos.

Fonte: Autora, 2023.

A média de idade do grupo de pacientes com ON foi de $64,8 \pm 9,5$ anos e do grupo de pacientes sem lesão de ON foi de $52,4 \pm 10,4$ ($p < 0,001$) (Figura 9). O nível sérico de Esclerostina foi maior no grupo de pacientes com ON ($240,5 \pm 368,6$) do

que os pacientes do grupo controle ($30,51 \pm 45,69$) ($p < 0,0001$) (Figura 10). A fosfatase alcalina sérica foi maior no grupo controle ($86,45 \pm 25,85$) comparado ao ON ($69,78 \pm 17,87$) ($p = 0,02$) (Figura 11).

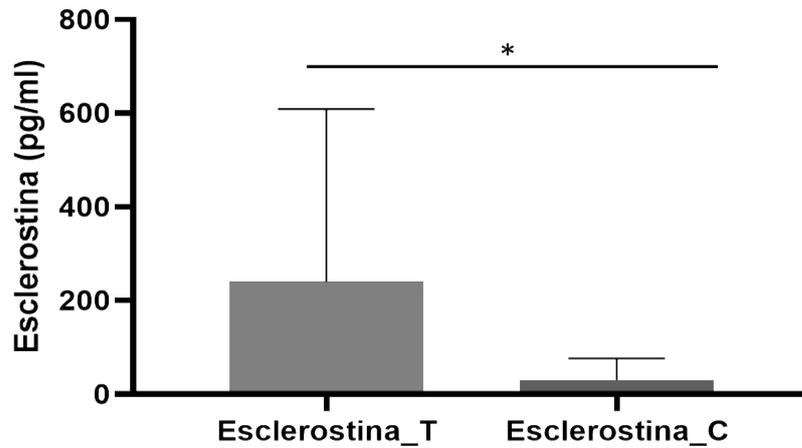
Figura 9 – Média de idade entre o grupo ON (T) e o grupo sem lesão de ON (C).



Legenda: Teste T não pareado. * $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

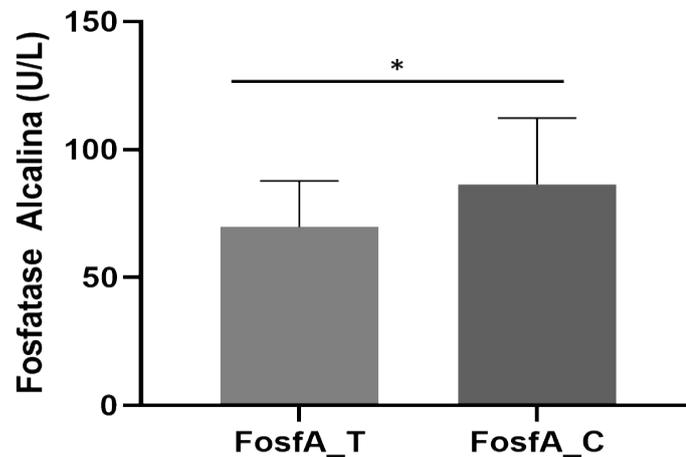
Figura 10 – Comparação entre Valores da Esclerostina (pg/ml) nos grupos com lesão de ON (T) e sem lesão de ON (C).



Legenda: Teste Mann Whitney. * $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 – Comparação entre Valores da Fosfatase Alcalina (U/L) nos grupos com lesão de ON (T) e sem lesão de ON (C).



Legenda: Teste T não pareado. * $p < 0,05$

Fonte: Elaborado pelo autor.

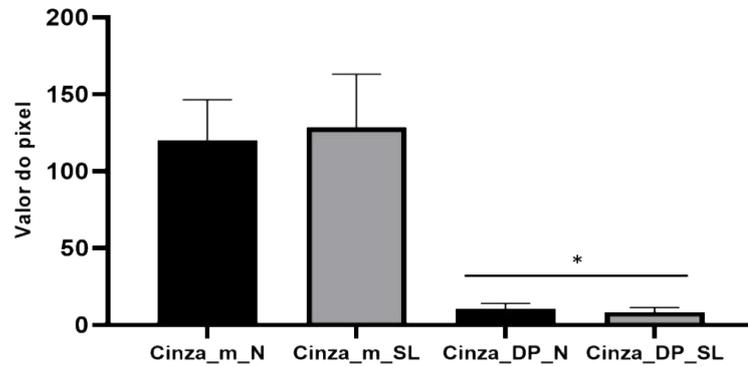
A avaliação do ICC na escolha das ROIs foi realizada e os resultados estão dispostos na tabela abaixo (Tabela 1). Dos 27 pacientes, apenas 20 pacientes apresentaram exames radiográficos com formato adequado (*Dicom*) para avaliação dos parâmetros pretendidos. Os parâmetros radiográficos não convencionais: valores médios de cinza (Cinza_m), Desvio padrão dos valores de cinza (Cinza_DP), Dimensão Fractal (FD) e Lacunaridade (Lac) foram avaliadas nas duas ROIs, na lesão de necrose (N) e na área contralateral sem lesão (SL). Os valores Cinza_m não obtiveram significância estatística entre os dois grupos comparados ($120,2 \pm 26,2$ vs $128,5 \pm 34,5$, $p = 0,36$). Já o Cinza_DP foi maior no grupo SL ($8,33 \pm 3,15$) do que comparado ao sítio lesional ($10,61 \pm 3,46$) ($p = 0,008$) (Figura 12). A FD ($1,21 \pm 0,05$ para N e $1,24 \pm 0,05$ para SL) e a Lac ($0,1 \pm 0,03$ para N e $0,09 \pm 0,02$ para SL) não foram diferentes nos sítios com e sem lesão ($p = 0,09$ e $p = 0,25$, respectivamente), Figuras 13 e 14).

Tabela 1 – Coeficiente de Correlação Intraclasse.

Parâmetros	ICC (medidas entre médias)	Concordância
Valor de Cinza médio	0,89	Excelente
Desvio Padrão do valor de cinza	0,82	Excelente
Dimensão Fractal	0,87	Excelente
Lacunaridade	0,64	Boa
Posição da ROI no eixo X	1,00	Excelente
Posição da ROI no eixo Y	0,99	Excelente

Fonte: Elaborado pelo autor.

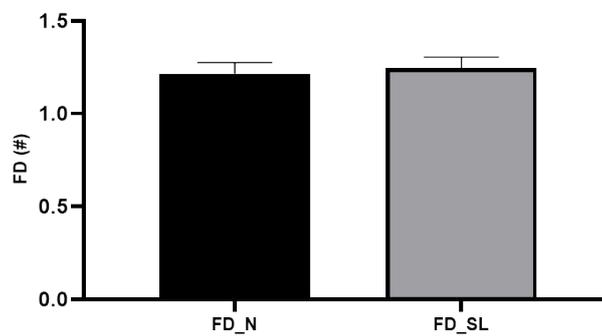
Figura 12 – Valores dos pixels de cinza nos grupos com lesão de ON (N) e sem lesão de ON (SL).



Legenda: Teste t comparativo para Cinza_m_. Teste Mann-Whitney comparativo para Cinza_DP. * $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

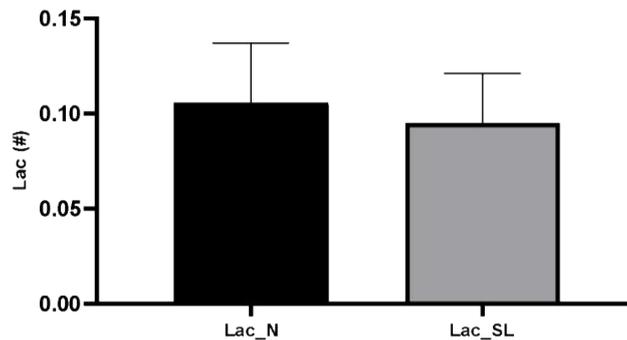
Figura 13 – Dimensão Fractal nos grupos com lesão de ON (N) e sem lesão de ON (SL).



Legenda: Teste t comparativo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 – Lacunaridade nos grupos com lesão de ON (L) e sem lesão de ON (SL).

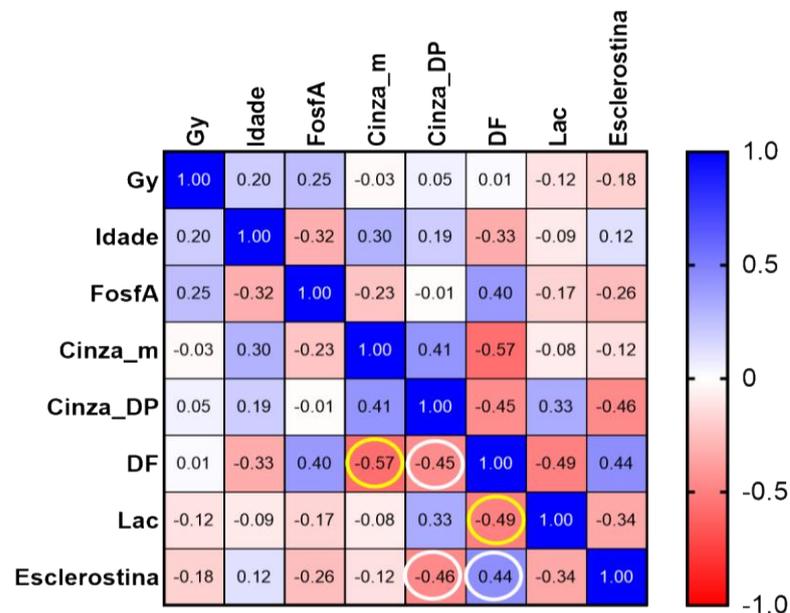


Legenda: Teste comparativo Mann-Whitney.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi realizado a correlação de Spearman entre as variáveis idade, dose de radiação (Gy), Fosfatase Alcalina (FosfA), Cinza_m, Cinza_DP, FD, Lac e Esclerostina (Figura 15). Na figura, círculos em amarelos representam correlação com significância estatística $p < 0,05$ e os círculos em branco representam uma tendência à significância com valores de p de 0,05 até 0,06. A FD obteve uma correlação negativa moderada com os valores de Cinza_m ($p < 0,05$) e Cinza_DP (p de 0,05 até 0,06), quando o valor da FD estava aumentado, os valores de Cinza_m e Cinza_DP estavam diminuídos. A lacunaridade também obteve uma correlação negativa moderada com a FD ($p < 0,05$), quando o valor da FD estava aumentado, os valores da lacunaridade estavam diminuídos. Já a Esclerostina obteve correlações com tendências à significância, onde foi moderada negativa com o Cinza_DP e moderada positiva com a FD.

Figura 15 – Matriz de correlação.



Legenda: Correlação de Spearman, valores de R. Valores mais próximos de 1 tem cor mais forte, sendo a cor vermelha representando correlações negativas e a cor azul representando as correlações positivas. Círculos em amarelo representam significância ($p < 0,05$) e círculos em branco representam tendência à significância ($0,05 < p \leq 0,06$).

Fonte: GraphPad Prism.

Na análise multivariada de fatores, a FosfA se relacionou significativamente com a etiologia na necrose, se ORN ou ONM, com o fator desencadeador (exodontia) e com o número de sítios. Já a Esclerostina não obteve valores significantes para os mesmos parâmetros (Tabela 2). De acordo com o número de sítios, encontramos maiores níveis de FosfA nos pacientes com apenas um sítio de necrose, do que aqueles com dois sítios ($p=0,01$) (Figura 16).

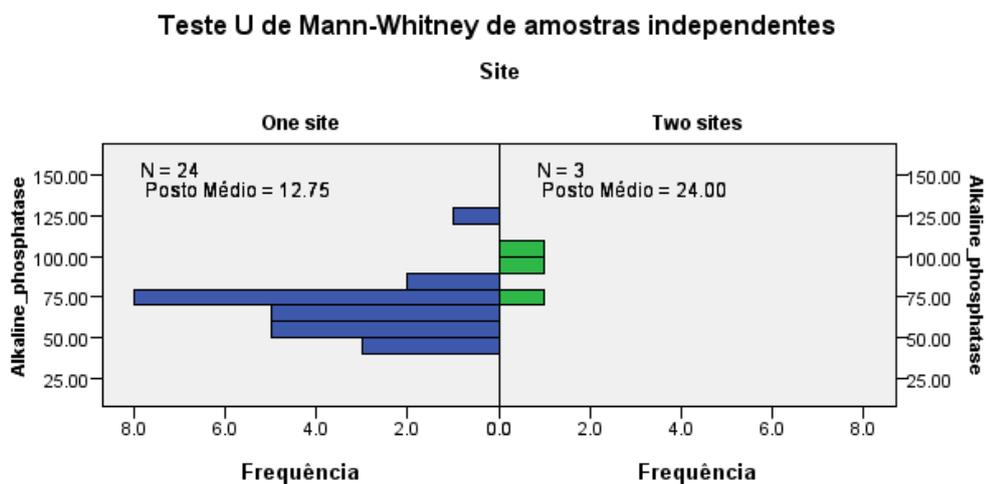
Tabela 2- Matriz de análise multivariada de fatores.

Variável dependente	Parâmetro	Sig.	Poder observado
Fosfatase Alcalina	Intercepto	,038*	,575
	Etiologia (ORN/ONM)	,001*	,964
	ON após exodontia	,004*	,900
	Nº de Sítios	,012*	,769
	Localização	,260	,193
	Estágio 01	,998	,050
	Estágio 02	,965	,050
	Estágio 03	.	.
Esclerostina	Intercepto	,112	,352
	Etiologia (ORN/ONM)	,814	,056
	ON após exodontia	,483	,102
	Nº de Sítios	,132	,319
	Localização	,108	,358
	Estágio 01	,757	,060
	Estágio 02	,165	,276
	Estágio 03	.	.

Legenda: análise multivariada. Sig significância estatística. * $p<0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16 – Valores de FosfA de acordo com a quantidade de sítios.



Legenda: Mann-Whitney, $p<0,05$.

Fonte: SPSS, IBM Statistics.

6 DISCUSSÃO

Este estudo conduzido em dois centros da região sul do Brasil revelou uma predominância do sexo masculino entre as amostras de necroses ósseas dos maxilares, ainda, com uma casuística bem mais proeminente de ORN comparada a ONM. A mandíbula representou a maioria dos casos, com uma incidência de mais de 90%. Sobre a análise dos biomarcadores, esse é o primeiro estudo que avalia os níveis da Esclerostina sérica em pacientes com ORN. Park et al. (2022) realizaram um estudo longitudinal onde avaliaram a esclerostina sérica e outros marcadores em 76 pacientes com histórico de terapia com bisfosfonatos sem ONM, que necessitavam de cirurgia dentoalveolar. Os valores séricos de Esclerostina foram comparados entre os grupos teste e controle antes da cirurgia dentoalveolar (T0 - linha de base), às 8 semanas de pós-operatório (T1- diagnóstico de ONM) e aos 4 meses após o diagnóstico (T2), porém sem resultados com significância estatística. Em nosso estudo, tanto Esclerostina, quanto Fosfatase Alcalina foram significativamente diferentes comparados aos indivíduos saudáveis, em uma dinâmica inversa, ou seja, níveis séricos mais altos de Esclerostina, acompanhados de níveis de Fosfatase Alcalina mais baixos, nos pacientes com ORN e ONM. Ainda, estes indivíduos tinham idade mais avançada, comparada aos do grupo controle. Este resultado pode estar associado pela falta de subgrupos em nossa comparação, por mais que a etiologia das necroses (ORN/ONM) sejam distintas, quando instaladas, a necrose apresenta características histopatológicas e clínicas distintas.

Em relação aos parâmetros radiográficos, o que se encontrou foi uma diferença significativa entre a variação dos tons de cinza nas áreas analisadas dentro do mesmo indivíduo, para os pacientes com necrose. De forma surpreendente, não houve diferença entre os dois índices radiográficos não convencionais analisados, a FD e a Lac. Sobre todos os parâmetros avaliados em conjunto, encontrou-se que existe uma tendência para significância de correlação entre os níveis séricos de Esclerostina e os achados radiográficos nos ossos maxilares, sendo eles a variação nos tons de cinza e a FD, o que mostra uma possível tendência de quanto maior o nível da Esclerostina sérica, menor variação entre os tons de cinza e aumento da FD, para os sítios lesionais. Os índices não convencionais também se correlacionaram de forma significativa, principalmente com

o aumento da FD se tem diminuição da Lac e da média do tom de cinza na região analisada.

Por ser uma proteína que inibe a formação óssea, era esperado que a Esclerostina estivesse em níveis mais altos para um grupo de indivíduos que estão com lesões ósseas ativas nos ossos maxilares. Ainda, que provavelmente, essa condição local pode estar influenciando nos achados sistêmicos destes indivíduos. Sobre uma análise de indivíduos com condições sistêmicas (e não locoregionais) e com níveis altos de Esclerostina, encontra-se na literatura estudos como o de Chen et al., (2022), que avaliaram o perfil sérico da Esclerostina em 71 pacientes com osteogênese imperfeita, 51 pacientes com hipofosfatemia ligada ao cromossomo X e 17 pacientes com Doença de Paget, comparando com um universo de 139 pacientes controles, pareando por idade, sexo e número de indivíduos para cada doença com seu respectivo número de pacientes avaliados. Assim como em nosso estudo, eles encontraram valores aumentados com significância estatística nos três grupos de doenças ósseas em comparação com o grupo controle, sendo os pacientes com a Doença de Paget os com os maiores níveis séricos. Entendemos que são doenças distintas e com etiologias diferentes da situação avaliada em nosso estudo, no entanto, vale discutir essa diversidade de situações com a Esclerostina aumentada, mesmo considerando estas variações entre condições sistêmicas e locais.

A informação sobre os níveis séricos da Esclerostina em alterações ósseas locais é escassa. Karali et al., (2020) avaliaram concentrações séricas de Esclerostina em pacientes com otite crônica com colesteatoma, sem colesteatoma e saudáveis. Essas otites causam destruição óssea, sendo o colesteatoma uma lesão epitelial destrutiva do osso temporal que interrompe o equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea. Foram encontrados níveis significativamente maiores em pacientes com estas otites em comparação com controles saudáveis, associando esses valores à presença de grande erosão óssea. Embora em uma condição distinta, mostrou-se que níveis séricos podem estar associados a condições locais e locoregionais, assim como no nosso estudo.

A Esclerostina é liberada principalmente pelos osteócitos, quando atentamos à condição óssea especificamente. Devido a esta característica, podemos esperar que a Esclerostina contribua na patogênese e progressão de doenças ósseas. Sendo a osteoporose a doença óssea mais estudada, foi averiguado a importância da Esclerostina e outros marcadores nesse processo de redução de massa óssea,

inclusive, esperando que pacientes com osteoporose apresentassem níveis séricos mais elevados dessa proteína. Contrariando essa expectativa, diversos estudos demonstraram níveis séricos diminuídos quando comparados com um grupo controle (BASIR et al., 2019; GORTER et al., 2022; RAMLI; CHIN, 2020). Basir et al., (2019) sugeriram que os níveis de Esclerostina são um reflexo da baixa massa óssea devido à osteoporose, e não um fator contribuinte para o desenvolvimento da mesma, ou seja, como a Esclerostina é liberada principalmente pelos osteócitos, os níveis séricos de Esclerostina poderiam ser um indicador indireto do número total de osteócitos. Transpondo esta lógica para as necroses ósseas dos maxilares, sabemos que em locais de necrose os números de osteócitos são baixos e muitas vezes inexistentes (WEINSTEIN; NICHOLAS; MANOLAGAS, 2000). Diante disso, o esperado seria níveis séricos de Esclerostina diminuídos se fosse considerado apenas o número destas células e o fato que fossem as únicas responsáveis pela produção dessa proteína. Para além do número das células, é importante considerar também as situações de expressão da Esclerostina. A função do osteócito e seus derivados, incluindo seu secretoma, mostra sua relação com diversas doenças e condições e que regula tanto formação quanto reabsorção. A Esclerostina secretada pelo osteócito, juntamente com citocinas inflamatórias e RANKL, promove reabsorção e inibe formação óssea na metástase óssea e no mieloma múltiplo. Ainda, no caso específico dos ossos maxilares, já se sabe que os osteócitos aceleram a patogênese da doença periodontal pela secreção de Esclerostina, DKK1 e potencialmente também o RANKL, promovendo perda óssea alveolar (KITASE; PRIDEAUX, 2023). Ou seja, entendeu-se neste estudo que a Esclerostina está aumentada em indivíduos com necroses ósseas nos ossos maxilares, e com certeza existe o envolvimento dos osteócitos neste processo, tanto de desenvolvimento quanto de progressão da lesão, no entanto, ainda sem informações diretas da associação com outras proteínas e no envolvimento de uma ou mais vias de sinalização, sendo importante aventar a possibilidade de averiguar estudos nesta área com a avaliação de marcadores associados, incluindo DKK1 e RANKL.

Também de forma interessante, é preciso entender a especificidade do estudo dos ossos maxilares, e que as lesões de necrose não correspondem ao osso como um todo, mas que, em ambas situações analisadas o osso estava sim comprometido, quer seja pena radiação ionizante previamente incidida naquela área pela radioterapia, ou na ação óssea global dos medicamentos antirreabsortivos dos

casos de ONM. Saber como é o comportamento do osso perilesional, do osso lesional e do *crosstalking* entre a área de necrose e o osso adjacente é crucial para um melhor entendimento da expressão de proteínas séricas e de achados radiográficos. Será que esse osso adjacente pode estar querendo suprir o equilíbrio expressando mais Esclerostina? Já que os osteócitos inviáveis/ausentes na necrose não estão operantes ou disponíveis. Outro ponto importante discutir é que a morte dos osteócitos e o dano ósseo desencadeiam a formação de osteoclastos em algumas situações específicas, como no caso da apoptose de osteócitos resultando em remodelação alvo-direcionada, e consequente reabsorção óssea naquele local, embora todo este mecanismo nas ONs ainda não esteja claro. O osso nas lesões de ONM não parece estar "congelado", mas ocorre uma reabsorção óssea muito ativa e a infecção provavelmente desempenha um papel fundamental na condução dessa reabsorção (REID; CUNDY, 2009).

Sobre o outro marcador clássico analisado, a FosfA é liberada na circulação durante a fase de formação óssea, e é considerada um grande indicador de regeneração do tecido ósseo. Nossos dados indicaram níveis menores de FosfA no grupo de pacientes com ON, do que os pacientes sem ON (controles), corroborando com a literatura. Estudos demonstram níveis absolutos mais baixos no momento do diagnóstico das ON, principalmente ONM, devido à ação dos bisfosfonatos nos osteoblastos (FIDAN et al., 2012; MORRIS et al., 2012). Demonstrando então, que os níveis séricos de FosfA diminuídos estão associados com a diminuição da remodelação óssea, encontramos menores níveis em pacientes com mais sítios de ON, indicando menor regeneração óssea.

Quanto aos parâmetros radiográficos quantitativos, não encontramos diferença entre os valores de FD entre as ROIs. A literatura traz diversas denominações para interpretação da FD, mas sabemos que ainda não há uma padronização da técnica. Arsan et al., (2017) afirmam que a FD aumentada representa uma arquitetura óssea complexa, com trabéculas mais densas e menos porosas. Torres et al., (2011) usaram a Tomografia Computadorizada (TC) para comparar a FD entre pacientes com ONM e pacientes saudáveis e demonstraram maiores valores de FD no grupo ONM (1,67-1,72) do que no grupo controle (1,65-1,67). Demiralp et al., (2019) também mediram FD em radiografias panorâmicas de 33 pacientes com ONM e os compararam com os de um grupo controle e seus resultados não demonstram significância estatística assim como em nosso estudo. A

maioria dos estudos faz a comparação com grupos de pacientes saudáveis, isto é, que não utilizam medicações antirreabsortivas e/ou receberam RI nos maxilares. Isso pode justificar nossa ausência de diferença entre nossos grupos analisados. Visto que, mesmo na ROI sem lesão (SL) o osso poderia indicar alterações arquiteturais devido à ação da RDT e das medicações. Não só a ausência de osso sem interferência alguma, mas entendeu-se também que tanto os índices convencionais (tons de cinza) e os não convencionais (FD e Lac) eram baseados nos tons de cinza nas ROIs analisadas, e por isso, por mais que estes índices também reflitam microarquitetura, por se tratarem dos valores de radiolucidez e radiopacidade na imagem, teriam que ver muito com a mineralização e o conteúdo mineral ósseo, e não apenas com a estrutura óssea trabecular avaliada.

Nos valores médios dos pixels de cinza também não encontramos diferença entre as ROIs, sendo justificado pelo motivo descrito anteriormente. Porém, no Cinza_DP, encontramos valores menores no grupo SL, isso nos indica que os valores de pixels variaram menos neste grupo, denotando uma qualidade óssea representada por maior homogeneidade na distribuição dos tons de cinza, sem grandes variâncias nas tonalidades ali encontradas. Maior variação de tons de cinza representada por alto valor de desvio-padrão indicam que, em uma área específica avaliada, a distribuição de pixels tinha grande variação entre radiopacidade e radiolucidez. Poderia esta variação estar mostrando influência nos aspectos trabeculares, com substituição dos trabeculado normal por áreas de osteólise e osteoesclerose? Acreditamos que sim, mas interpretamos com cautela e com necessidade de avaliações futuras.

A grande limitação do nosso estudo foi o grupo controle da avaliação sérica não estar parado por idade. Na clínica, a coleta de pacientes saudáveis (sem comorbidades ósseas, osteometabólicas e hepáticas) acima de 50 anos é de grande dificuldade, porém, quando comparamos nossos valores séricos de Esclerostina com os valores dos grupos controles da literatura observamos valores semelhantes, apesar da dificuldade de comparação devido aos ensaios ELISA serem de marcas e fabricantes distintos. Um grupo controle para comparação dos índices radiográficos quantitativos parece ser o ideal, apesar da literatura também não encontrar dados significantes em alguns casos. O uso da TC para a análise fractal também seria uma ferramenta complementar para avaliação arquitetural do osso, porém, na prática clínica, a radiografia panorâmica é mais solicitada, facilitando seu uso nos estudos

clínicos multicêntricos e em uma eventual democratização no uso destas metodologias.

Por fim, devido ao ineditismo de nossos dados quanto aos valores de Esclerostina e Fosfatase alcalina nas ON, mais estudos devem ser realizados e encorajados, sendo este a porta inicial para estudos promissores nesta linha, principalmente, com uma amostra maior e outros subgrupos de comparação (pacientes que receberam RI e medicações antirreabsortivas e não apresentam ON).

7 CONCLUSÃO

A Esclerostina sérica foi maior no grupo de pacientes com ON, revelando um papel importante nas condições de ORN e ONM, estando aproximadamente oito vezes mais alta comparada aos níveis em indivíduos sem doenças osteometabólicas. A FosfA foi menor em pacientes com ON e mostrou relação com a etiologia da necrose, se ORN ou ONM, com o fator desencadeador (exodontia) e com o número de sítios lesionais. Em relação aos aspectos radiográficos, a variação nos tons de cinza foi mais alta nos sítios de necrose, ou seja, apresentaram uma maior variação nos valores dos pixels revelando maior amplitude dos valores indo do preto ao branco.

8 REFERÊNCIAS

A. KAPERIEN. **Welcome to the User's Guide for FracLac, V. 2.5**. Disponível em: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/fractal/FLHelp/Introduction.htm>>. Acesso em: 12 abr. 2023.

ALFOUZAN, A. F. Radiation therapy in head and neck cancer. **Saudi Medical Journal**, v. 42, n. 3, p. 247–254, 24 mar. 2021.

ALLEN, M. R.; BURR, D. B. The Pathogenesis of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw: So Many Hypotheses, So Few Data. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 67, n. 5, p. 61–70, 1 maio 2009.

ARCE, K. et al. Imaging Findings in Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of Jaws. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 67, n. 5 SUPPL., p. 75–84, 1 maio 2009.

ARSAN, B. et al. Assessment of the trabecular structure of mandibular condyles in patients with temporomandibular disorders using fractal analysis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 123, n. 3, p. 382–391, mar. 2017.

BALEMANS, W. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). **Human Molecular Genetics**, v. 10, n. 5, p. 537–543, 1 mar. 2001.

BARON, R.; FERRARI, S.; RUSSELL, R. G. G. Denosumab and bisphosphonates: Different mechanisms of action and effects. **Bone**, v. 48, n. 4, p. 677–692, abr. 2011.

BARON, R.; KNEISSEL, M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. **Nature Medicine**, v. 19, n. 2, p. 179–192, 6 fev. 2013.

BARON, R.; RAWADI, G. Minireview: Targeting the Wnt/-Catenin Pathway to Regulate Bone Formation in the Adult Skeleton. 2007.

BASIR, H. et al. Relationship Between Osteoporosis and Serum Sclerostin Levels in Kidney Transplant Recipients. **Experimental and Clinical Transplantation**, 16 set. 2019.

BELLIDO, T.; PLOTKIN, L. I.; BRUZZANITI, A. Bone Cells. In: **Basic and Applied Bone Biology**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 27–45.

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 337–342, maio 2003.

BRAS, J.; DE JONGE, H. K. T.; VAN MERKESTEYN, J. P. R. Osteoradionecrosis of the mandible: Pathogenesis. **American Journal of Otolaryngology**, v. 11, n. 4, jul. 1990.

CAMBRAIA FARIA, G. et al. Dimensão fractal e lacunaridade como parâmetros de avaliação da qualidade óssea na mandíbula de indivíduos saudáveis: análise por meio da tomografia computadorizada de feixe cônico. **HU Revista**, v. 47, n. SE-

Artigos Originais, p. 1–7, 18 mar. 2021.

CHAPURLAT, R. D.; CONFAVREUX, C. B. Novel biological markers of bone: from bone metabolism to bone physiology. **Rheumatology**, v. 55, n. 10, out. 2016.

CHEN, J. et al. Fractal Analysis of Trabecular Patterns in Projection Radiographs. **Investigative Radiology**, v. 29, n. 6, jun. 1994.

CHEN, L. et al. Serum Sclerostin and Its Association with Bone Turnover Marker in Metabolic Bone Diseases. **Disease Markers**, v. 2022, p. 1–8, 10 set. 2022.

CHRONOPOULOS, A. et al. Osteoradionecrosis of the jaws: definition, epidemiology, staging and clinical and radiological findings. A concise review. **International Dental Journal**, v. 68, n. 1, fev. 2018a.

CHRONOPOULOS, A. et al. Osteoradionecrosis of the jaws: definition, epidemiology, staging and clinical and radiological findings. A concise review. **International Dental Journal**, v. 68, n. 1, p. 22–30, fev. 2018b.

CROSS, S. S. FRACTALS IN PATHOLOGY. **The Journal of Pathology**, v. 182, n. 1, p. 1–8, maio 1997.

DA SILVA, M. E. B. et al. Fractal analysis of dental periapical radiographs: A revised image processing method. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 135, n. 5, p. 669–677, maio 2023.

DELANIAN, S.; LEFAIX, J. . Radionécrose de l'os mature : connaissance physiopathologique récente motrice d'une thérapeutique médicale innovante. **Cancer/Radiothérapie**, v. 6, n. 1, fev. 2002.

DEMIRALP, K. Ö. et al. Trabecular structure designation using fractal analysis technique on panoramic radiographs of patients with bisphosphonate intake: a preliminary study. **Oral Radiology**, v. 35, n. 1, p. 23–28, 15 jan. 2019.

DERER, A. et al. Radio-Immunotherapy-Induced Immunogenic Cancer Cells as Basis for Induction of Systemic Anti-Tumor Immune Responses – Pre-Clinical Evidence and Ongoing Clinical Applications. **Frontiers in Immunology**, v. 6, 8 out. 2015.

DINCEL, A. S.; JØRGENSEN, N. R. New Emerging Biomarkers for Bone Disease: Sclerostin and Dickkopf-1 (DKK1). **Calcified Tissue International**, v. 112, n. 2, p. 243–257, 27 set. 2022.

DRAKE, M. T.; KHOSLA, S. Hormonal and systemic regulation of sclerostin. **Bone**, v. 96, p. 8–17, mar. 2017.

FELICIA COSMAN , DARIA B CRITTENDEN, A. G. Romosozumab Treatment in Postmenopausal Osteoporosis. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 4, p. 395–397, 26 jan. 2017.

FERNANDES, C.; LEITE, R. S.; LANÇAS, F. M. Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 274–280, mar.

2005.

FIDAN, E. et al. Effects of zoledronic acid and ibandronic acid on renal functions and calcium, phosphorus and alkaline phosphatase levels in breast cancer patients with bone metastases: a retrospective analysis. **Współczesna Onkologia**, v. 2, p. 176–178, 2012.

FRANCIOTTI, R. et al. Use of fractal analysis in dental images for osteoporosis detection: a systematic review and meta-analysis. **Osteoporosis International**, v. 32, n. 6, p. 1041–1052, 28 jun. 2021.

GORTER, E. A. et al. Serum sclerostin levels in osteoporotic fracture patients. **European Journal of Trauma and Emergency Surgery**, v. 48, n. 6, p. 4857–4865, 16 dez. 2022.

HADAYA, D. et al. Clinically Relevant Doses of Sclerostin Antibody Do Not Induce Osteonecrosis of the Jaw (ONJ) in Rats with Experimental Periodontitis. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 34, n. 1, p. 171–181, jan. 2019.

HANLEY, D. A. et al. Denosumab: mechanism of action and clinical outcomes. **International Journal of Clinical Practice**, v. 66, n. 12, p. 1139–1146, 12 dez. 2012.

INAGAKI, Y. et al. Sclerostin expression in bone tumours and tumour-like lesions. **Histopathology**, v. 69, n. 3, p. 470–478, set. 2016.

IRIE, M. S. et al. Use of Micro-Computed Tomography for Bone Evaluation in Dentistry. **Brazilian Dental Journal**, v. 29, n. 3, maio 2018.

IZZETTI, R. et al. Panoramic Radiography Features of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws (MRONJ). **International Journal of Dentistry**, v. 2023, p. 1–8, 29 maio 2023.

KALITA, F. et al. Osteonecrosis of the Jaws: An Update and Review of Literature. **Journal of Maxillofacial and Oral Surgery**, v. 22, n. 2, p. 344–351, 5 jun. 2023.

KARALI, E.; YIS, O. M. Serum sclerostin levels in chronic otitis media with and without cholesteatoma. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 66, n. 7, p. 966–972, jul. 2020.

KATO, C. N. et al. Use of fractal analysis in dental images: a systematic review. **Dentomaxillofacial Radiology**, v. 49, n. 2, p. 20180457, fev. 2020.

KAVEH, S. et al. Efficacy and safety of Romosozumab in treatment for low bone mineral density: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Rheumatology**, v. 39, n. 11, p. 3261–3276, 8 nov. 2020.

KEARNEY, M.; COFFEY, M.; LEONG, A. A review of Image Guided Radiation Therapy in head and neck cancer from 2009–2019 – Best Practice Recommendations for RTTs in the Clinic. **Technical Innovations & Patient Support in Radiation Oncology**, v. 14, p. 43–50, jun. 2020.

KITASE, Y.; PRIDEAUX, M. Regulation of the Osteocyte Secretome with Aging and Disease. **Calcified Tissue International**, 6 maio 2023.

KLINGELHÖFFER, C. et al. Can dental panoramic radiographic findings serve as indicators for the development of medication-related osteonecrosis of the jaw? **Dentomaxillofacial Radiology**, v. 45, n. 5, maio 2016.

KUBO, R. et al. Panoramic radiographic features that predict the development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Oral Radiology**, v. 34, p. 151–160, 2018.

KUEHN, S.; SCARIOT, R.; ELSALANTY, M. Medication-Related Osteonecrosis: Why the Jawbone? **Dentistry Journal**, v. 11, n. 5, p. 109, 23 abr. 2023.

KURODA, T. et al. Relationship Between Changes in Serum Levels of Intact Parathyroid Hormone and Sclerostin After a Single Dose of Zoledronic Acid: Results of a Phase 1 Pharmacokinetic Study. **Calcified Tissue International**, v. 110, n. 1, p. 87–92, 24 jan. 2022.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159–74, mar. 1977.

LERNER, U. H.; OHLSSON, C. The WNT system: background and its role in bone. **Journal of Internal Medicine**, v. 277, n. 6, p. 630–649, jun. 2015.

LIM, S. Y.; BOLSTER, M. Profile of romosozumab and its potential in the management of osteoporosis. **Drug Design, Development and Therapy**, v. Volume11, p. 1221–1231, abr. 2017.

LIPTON, A. et al. Treatment-Induced Bone Loss and Fractures in Cancer Patients Undergoing Hormone Ablation Therapy: Efficacy and Safety of Denosumab. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, v. 6, p. CMO.S8511, 16 jan. 2012.

MA, S. et al. Long-term effects of bisphosphonate therapy: perforations, microcracks and mechanical properties. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 43399, 6 mar. 2017.

MADEIRA, M. S. S. M. D. M. W. S. C. A. M. L. F. DE F. **Guia Prático em Osteometabolismo**. 1. ed. [s.l.] Clannad, 2019.

MALLICK, I.; WALDRON, J. N. Radiation Therapy for Head and Neck Cancers. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 25, n. 3, p. 193–202, ago. 2009.

MARIE, P. Physiologie du tissu osseux. **Immuno-analyse & Biologie Spécialisée**, v. 7, n. 6, p. 17–24, dez. 1992.

MARINI, F. et al. Role of Wnt signaling and sclerostin in bone and as therapeutic targets in skeletal disorders. **Osteoporosis International**, v. 34, n. 2, p. 213–238, 18 fev. 2023.

MARX, R. E. Osteoradionecrosis: A new concept of its pathophysiology. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 41, n. 5, maio 1983.

MARX, R. E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: A growing epidemic [1]. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 61, n. 9, p. 1115–1117, 1 set. 2003.

MEYER, I. Infectious diseases of the jaws. **Journal of oral surgery (American Dental Association : 1965)**, v. 28, n. 1, p. 17–26, jan. 1970.

MORASCHINI, V. et al. Association between biomarkers and medication-related osteonecrosis of the jaws: a systematic review. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 127, n. 6, p. 504–515, jun. 2019.

MORRIS, P. G. et al. Serum N-Telopeptide and Bone-Specific Alkaline Phosphatase Levels in Patients With Osteonecrosis of the Jaw Receiving Bisphosphonates for Bone Metastases. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 70, n. 12, p. 2768–2775, dez. 2012.

ORTIGARA, G. B. et al. Late radiation effects in survivors of head and neck cancer: State of the science. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 162, p. 103335, jun. 2021.

PAPAPOULOS, S. E. Bisphosphonate actions: Physical chemistry revisited. **Bone**, v. 38, n. 5, p. 613–616, maio 2006.

PELLETIER, S.; JEAN, G.; FOUQUE, D. Sclerostin: a new biomarker of interest in nephrology. **Annales de biologie clinique**, v. 73, n. 3, maio 2015.

PIERCE, J. L. et al. Defining osteoblast and adipocyte lineages in the bone marrow. **Bone**, v. 118, p. 2–7, jan. 2019.

RAMLI, F. F.; CHIN, K.-Y. A Review of the Potential Application of Osteocyte-Related Biomarkers, Fibroblast Growth Factor-23, Sclerostin, and Dickkopf-1 in Predicting Osteoporosis and Fractures. **Diagnostics**, v. 10, n. 3, p. 145, 6 mar. 2020.

REID, I. R.; BOLLAND, M. J.; GREY, A. B. Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? **Bone**, v. 41, n. 3, p. 318–320, 1 set. 2007.

REID, I. R.; CUNDY, T. Osteonecrosis of the jaw. **Skeletal Radiology**, v. 38, n. 1, p. 5–9, 23 jan. 2009.

ROGERS, M. J.; MÖNKKÖNEN, J.; MUNOZ, M. A. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates and new insights into their effects outside the skeleton. **Bone**, v. 139, p. 115493, out. 2020.

RUGGIERO, S. L. 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**, v. 72, n. 10, p. 1938–1956, 2014.

RUGGIERO, S. L. et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons' Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws—2022 Update. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 80, n. 5, p. 920–943, maio 2022.

- RUSSELL, R. G. G. et al. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. **Osteoporosis International**, v. 19, n. 6, p. 733–759, 24 jun. 2008.
- ŞAHİN, O. et al. Comparison of findings of radiographic and fractal dimension analyses on panoramic radiographs of patients with early-stage and advanced-stage medication-related osteonecrosis of the jaw. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 128, n. 1, jul. 2019.
- SANTOS, I. G. et al. Fractal dimension, lacunarity, and cortical thickness in the mandible: Analyzing differences between healthy men and women with cone-beam computed tomography. **Imaging Science in Dentistry**, v. 53, 2023.
- SAPIR-KOREN, R.; LIVSHITS, G. Osteocyte control of bone remodeling: is sclerostin a key molecular coordinator of the balanced bone resorption–formation cycles? **Osteoporosis International**, v. 25, n. 12, p. 2685–2700, 17 dez. 2014.
- SCHIAVI, S. C. Sclerostin and CKD-MBD. **Current Osteoporosis Reports**, v. 13, n. 3, 19 jun. 2015.
- SCHWARTZ, H. C.; KAGAN, A. R. Osteoradionecrosis of the Mandible. **American Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 2, p. 168–171, abr. 2002.
- SEO, M. H. et al. The effects of pentoxifylline and tocopherol in jaw osteomyelitis. **Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 46, n. 1, p. 19, 2020.
- SHARMA, U.; PAL, D.; PRASAD, R. Alkaline Phosphatase: An Overview. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 269–278, 26 jul. 2014.
- SINGH, S. et al. A systematic review and meta-analysis of efficacy and safety of Romosozumab in postmenopausal osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 33, n. 1, p. 1–12, 25 jan. 2022.
- SURYAWANSHI, A. et al. Maxillofacial osteoradionecrosis. **Journal of Dental Research and Review**, v. 1, n. 1, p. 42, 2014.
- THOMAS, T.; MARTIN, A.; LAFAGE-PROUST, M.-H. Physiologie du tissu osseux. **EMC - Appareil locomoteur**, v. 3, n. 1, p. 1–16, jan. 2008.
- TIAN, A. et al. Reference markers of bone turnover for prediction of fracture: a meta-analysis. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 14, n. 1, p. 68, 28 dez. 2019.
- TORRES, S. et al. Fractal dimension evaluation of cone beam computed tomography in patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis. **Dentomaxillofacial Radiology**, v. 40, n. 8, dez. 2011.
- VAN BEZOOIJEN, R. L. et al. Sclerostin in Mineralized Matrices and van Buchem Disease. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 6, p. 569–574, 8 jun. 2009.
- WADIA, R. Biomarkers and MRONJ. **British Dental Journal**, v. 226, n. 10, p. 794–

794, 24 maio 2019.

WAN, J. T. et al. Mitigating osteonecrosis of the jaw (ONJ) through preventive dental care and understanding of risk factors. **Bone Research**, v. 8, n. 1, p. 14, 11 mar. 2020.

WEINSTEIN, R. S.; NICHOLAS, R. W.; MANOLAGAS, S. C. Apoptosis of Osteocytes in Glucocorticoid-Induced Osteonecrosis of the Hip ¹. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 8, p. 2907–2912, ago. 2000.

WEIVODA, M. M.; YOUSSEF, S. J.; OURSLER, M. J. Sclerostin expression and functions beyond the osteocyte. **Bone**, v. 96, p. 45–50, mar. 2017.

WHITE, S. C.; RUDOLPH, D. J. Alterations of the trabecular pattern of the jaws in patients with osteoporosis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 88, n. 5, p. 628–635, 1 nov. 1999.

WINKLER, D. G. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 23, p. 6267–6276, 1 dez. 2003.

WITTE, F. et al. Comprehensive expression analysis of all Wnt genes and their major secreted antagonists during mouse limb development and cartilage differentiation. **Gene Expression Patterns**, v. 9, n. 4, p. 215–223, abr. 2009.

YOKOTA, Y. et al. Clinical Application of the Ratio of Serum Bone Isoform to Total Alkaline Phosphatase in General Practice. **Acta medica Okayama**, v. 74, n. 6, p. 467–474, dez. 2020.

1 APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA

Gostaríamos de convidar você a participar como voluntário (a) da pesquisa: ***Esclerostina como biomarcador no monitoramento das necroses ósseas dos maxilares.***

Justificativa: As necroses ósseas dos maxilares tanto por medicações ou por radiação ionizante são complicações na boca que podem ocorrer depois do tratamento do câncer, e são de difícil manejo, além de alterarem a qualidade de vida do paciente, podendo levar a perdas dentárias, dificuldades na fala e alimentação. Por esse motivo, investigar e estudar estratégias de diagnóstico e avaliação da condição à distância, isto é, sem manipulação óssea, com análises de biomarcadores séricos ou análises de parâmetros radiográficos é de extrema importância para o auxílio do entendimento da condição, além de desenvolver e aprimorar estudos para o diagnóstico, tratamento e manejo dessa condição.

Procedimento: Caso você concorde em participar, iremos realizar as seguintes atividades com você: Iremos realizar coletas de sangue, tomadas radiográficas (radiografia panorâmica) e registros fotográficos das lesões de osteonecrose em dois tempos separados por um intervalo cinco meses. Estes exames já seriam solicitados de qualquer forma durante seu tratamento para saber se sua condição está melhorando, e neste caso, estes exames serão usados na pesquisa também.

Desconforto ou riscos: Pode ocorrer leve desconforto durante a coleta da amostra de sangue. A realização do exame radiográfico não será exclusiva para a realização da pesquisa, e sim parte do seu acompanhamento no núcleo de odontologia hospitalar do HU-EBSERH, o exame radiográfico não apresenta contraindicações no seu caso e apresenta o benefício que propõe avaliar a qualidade do osso necrosado e manter seu acompanhamento e terapêutica necessária, apesar do risco mínimo da radiação ionizante do exame. Pode ocorrer possibilidade de quebra de sigilo de identificação, que será evitada ao máximo, pois iremos identificá-lo utilizando códigos, ao invés dos dados pessoais como seu nome. Pode ocorrer possibilidade de quebra de sigilo de identificação pela imagem, pois partes de seu rosto podem aparecer na foto. Esta quebra será evitada ao máximo com desfoque de estruturas faciais que sejam possíveis de reconhecê-lo, além disso o foco das fotografias é apenas da região intraoral.

A sua participação na pesquisa não altera o tratamento e acompanhamento de sua doença.

Método alternativo de tratamento: Não haverá método alternativo de tratamento.

Benefícios: O (a) Sr. (a) não terá nenhum benefício imediato com a participação no estudo. No entanto, o estudo ajudará a obter informações e conhecimentos futuros que auxiliarão em um

entendimento mais aprofundado sobre necroses ósseas dos maxilares. A participação na pesquisa não reverterá em benefícios diretos ao participante.

Ficha de coleta e privacidade: Os dados referentes à sua identificação (nome, telefone e número do prontuário), saúde (história médica pregressa, história odontológica pregressa) e tratamento (modalidades de tratamento para osteonecrose) serão anotados em uma ficha de coleta que ficará sob responsabilidade do pesquisador responsável, com a garantia de que haverá sigilo quanto a sua identidade. Os resultados obtidos ficarão sob a responsabilidade dos pesquisadores envolvidos no projeto, e serão utilizados como dados de pesquisa científica, podendo vir a serem divulgados em artigos e/ou congressos, resguardando-se sempre o sigilo quanto à sua identificação. No entanto, o Sr(a) poderá ter acesso aos resultados provenientes das análises, caso seja do seu interesse.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável e a outra será fornecida a você. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Dúvidas: Qualquer dúvida, não receie em perguntar quantas vezes necessário, e o (a) Sr(a) será esclarecido em qualquer momento da pesquisa.

Retirada do Consentimento: Caso não deseje participar dessa pesquisa ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, poderá fazê-lo em qualquer momento sem qualquer prejuízo ou punição.

Despesas: A participação nesta pesquisa não implicará em qualquer despesa ao Sr(a). Possíveis gastos poderão ser ressarcidos, incluindo àqueles de transporte e alimentação no dia da coleta de dados.

Resultado: Caso o Sr(a) tenha interesse em saber o resultado, entre em contato com os pesquisadores nos telefones abaixo, caso esse questionamento seja presencial, o pesquisador entrará em contato com o Sr(a) por telefone ou email para lhe divulgar o resultado. O resultado obtido da pesquisa não alterará em nada o tratamento e/ou seguimento do Sr(a). Para participar deste estudo você não vai ter nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, se você tiver algum dano por causa das atividades que fizermos com você nesta pesquisa, você tem direito a indenização.

Eu, _____,
abaixo assinado, declaro que consinto participar no trabalho intitulado “**Esclerostina como biomarcador no monitoramento das necroses ósseas dos maxilares.**”, e declaro que fui satisfatoriamente esclarecido e que estou livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa sem que isso implique em prejuízo ao meu tratamento e que não preciso apresentar justificativas para isso. Sei também de todas as informações por mim fornecidas e os resultados obtidos na pesquisa só serão utilizados para divulgação científica em reuniões e revistas científicas. Serei informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato desses poderem mudar meu consentimento em participar da pesquisa. Concordo também em responder às questões contidas no formulário que me foi apresentado (ficha de coleta de dados). E autorizo os

pesquisadores (Gustavo Davi Rabelo, Riéli Elis Schulz, Kelli Naiara Scatolin, Aira Maria Bonfim Santos, Liliâne Janete Grando) do projeto de pesquisa intitulado “**Esclerostina como biomarcador no monitoramento das necroses ósseas dos maxilares.**” a realizar as fotos que serão necessárias sem quaisquer ônus financeiros a nenhuma das partes. Ao mesmo tempo, autorizo a utilização destas fotos (suas respectivas cópias) somente para fins científicos e de estudos (livros, artigos e slides), em favor desta pesquisa, porém não devo ser identificado por nome ou qualquer outra forma.

Qualquer dúvida contatará um dos pesquisadores envolvidos na pesquisa, Gustavo Davi Rabelo pelo telefone (048) 3721-9520 ou (34) 99335-0844 e e-mail dr_gustavorabelo@yahoo.com.br, e Riéli Elis Schulz, telefone (55) 99633-4555 e e-mail rieli.elis.schulz@posgrad.ufsc.br, para questões relacionadas à pesquisa. O pesquisador Gustavo Davi Rabelo poderá ser encontrado na Sala de Professores da Estomatologia, Bloco D, Sala D210 no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina, na rua Delfino Conti, sem número, Bairro Trindade, Florianópolis/SC. Em caso de queixas e/ou dúvidas sobre o andamento ético da pesquisa e informações/esclarecimentos, por favor, entre em contato o **Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH-UFSC)**, situado no Prédio Reitoria II, 4º andar, sala 401, localizado na Rua Desembargador Vitor Lima, nº 222, Trindade, Florianópolis - Telefone para contato: 3721-6094. O CEPSH é um órgão colegiado interdisciplinar, deliberativo, consultivo e educativo, vinculado à Universidade Federal de Santa Catarina, mas independente na tomada de decisões, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

Assim, concordo em participar da pesquisa em questão. Declaro ainda que uma via do presente Termo de Consentimento me foi entregue, assinada e rubricada pelos pesquisadores.

Assinatura do participante:

Eu, pesquisador responsável pela pesquisa, confirmo que irei cumprir todas as normas e orientações da Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Assinatura do pesquisador responsável:

Florianópolis, ____ de _____ de _____.