



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



FAUSTO FRIZZERA BORGES FILHO

Avaliação da remodelação óssea após a interrupção do tratamento com bifosfonato por um período prolongado e seu efeito sobre a osseointegração de implantes.

ARARAQUARA

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

FAUSTO FRIZZERA BORGES FILHO

Avaliação da remodelação óssea após a interrupção do tratamento com bifosfonato por um período prolongado e seu efeito sobre a osseointegração de implantes.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: *Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico*

Co-orientador: *Dra. Gabriela Giro*

ARARAQUARA

2012

Borges Filho, Fausto Frizzera

Avaliação da remodelação óssea após a interrupção do tratamento com bifosfonato por um período prolongado e seu efeito sobre a osseointegração de implantes / Fausto Frizzera Borges Filho. Araraquara: [s.n.], 2012.

117 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientador: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

1. Alendronato 2. Remodelação óssea 3. Marcadores biológicos 4. Densidade óssea 5. Osseointegração I. Título

FAUSTO FRIZZERA BORGES FILHO

**AVALIAÇÃO DA REMODELAÇÃO ÓSSEA APÓS A INTERRUPÇÃO
DO TRATAMENTO COM BIFOSFONATO POR UM PERÍODO
PROLONGADO E SEU EFEITO SOBRE A OSSEOINTEGRAÇÃO DE
IMPLANTES.**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

2º Examinador: Prof. Dr. Jamil Awad Shibli

3º Examinador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

4º Examinador: Prof. Dr. Valfrido Antônio Pereira Filho

5º Examinador: Prof. Dr. João Batista César Neto

Araraquara, 16 de março de 2012.

DADOS CURRICULARES

Fausto Frizzera Borges Filho

Nascimento	26.03.1986 – Vitória/ES, Brasil
Filiação	Fausto Frizzera Borges Rita de Cássia Valiate Martins
2004/2008	Graduação em Odontologia Universidade Federal do Espírito Santo – UFES
2009/2010	Especialização em Periodontia Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp
2010/2012	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração Periodontia, nível Mestrado Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

“(...) a touch is a blow,
a sound is a noise,
a misfortune is a tragedy,
a joy is an ecstasy,
a friend is a lover,
a lover is a god,
and failure is death”

Pearl Buck

Dedico esta dissertação...

Ao meu pai

Que sempre me apoiou nos meus estudos e decisões. Possibilitou com sua vista grossa que me tornasse uma pessoa melhor, sempre fazendo questão de mostrar que meus resultados eram necessários e nada mais do que uma obrigação. Mais uma vez obrigado por me mostrar que sempre posso melhorar.

A minha mãe

Que sempre foi uma verdadeira mãe, se preocupando comigo e com meu futuro. Sua ajuda foi extremamente necessária para que minha estadia na cidade de Araraquara fosse a mais agradável possível.

Aos meus irmãos

Lucas e Camilla que apesar da distância ainda estão presentes na minha vida e por saber que posso contar com eles em qualquer momento da minha vida.

Ao meu afilhado

José Henrique, pelo carinho que tenho quando vou te visitar e pela alegria que traz a minha vida. Sinto a sua falta.

Ao meu padrinho

Que sempre esteve presente na minha vida, me ensinando a ser uma pessoa calma e a ouvir aos outros.

A minha madrinha

Que sempre rezou por mim e me estimulou a ter fé. Muito obrigado!

A minha enorme família

Que sempre me faz rir e me diverte nas nossas reuniões.

Aos meus primos e amigos

Pelo companheirismo e amizade fornecida durante todos esses anos.

Agradecimentos...

A minha orientadora

Silvana Regina Perez Orrico, simplesmente por permitir meu desenvolvimento científico, sendo exemplo de profissionalismo, compromisso e seriedade. Muito obrigado por tudo Professora.

A minha co-orientadora

Gabriela Giro, pela grande ajuda no desenvolvimento, execução e correção da dissertação. Pelas diversas horas desprendidas para me ensinar como co-orientadora. Obrigado!

Ao meu grande amigo e parceiro de trabalho

Mario Verzola, doutorando em Implantodontia, pelas intermináveis horas de trabalho e convívio nestes últimos anos. Os conselhos e ensinamentos foram de grande valia!

À Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP)

Na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla, e da Vice-Diretora, Profa. Dra. Andreia Affonso Barretto Montandon, pelas condições oferecidas para a realização desta pesquisa.

Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Odontologia

Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho, e a todos os docentes do Curso de Pós-Graduação do Programa de Periodontia, pela excelente formação, dedicação, competência e empenho em suas atividades.

As agências de fomento

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento - CNPQ e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos Docentes do departamento de Diagnóstico e Cirurgia

Que ministraram aulas ou colaboraram com minha formação: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico, Prof. Dr. Ricardo Samih Georges Abi Rached, Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior, Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiéricsi Marcantonio, Prof. Dr.

Carlos Rossa Júnior, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, Gulnara Scaf, Marisa Gabrielli, Valfrido Pereira Filho, Eduardo Hochulli, Roberto Henrique Barbeiro, Elaine Massucato, Mirian Onofre.

Aos meus amigos de turma de Mestrado

Fabiana, Felipe, Fernanda, Giovana, Lívia, Luiz, Marcell, Pablo, Rafael, Sabrina, por permanecer juntos após bons e maus momentos e pelos 2 anos que ficarão na minha memória pro resto da minha vida, espero reencontrá-los em Vitória!

Aos amigos da Pós-Graduação em Periodontia/Implantodontia

Alliny, Andressa, Ana Lúcia, Andrés, Cássia, Cláudio, Chaine, Daniela, Felipe, Guilherme, Humberto, João C., João S., Jonatas, Leila, Lívia, Luana, Lucas, Mário, Marina, Michele, Morgana, Nicole, Nicolau, Rodrigo, Rubinho, Rubão, Sabrina, Sâmia, Shelon, Túlio, Telma, Yeon e Wagner pela diversão constante, companheirismo e transmissão incessável de conhecimento. Aprendi muito com todos vocês, muito obrigado!

Aos amigos da Pós-Graduação em Endodontia

Ana Livia, Arturo, Carol, Giselle, Norberto, Raqueli, Letícia, Adinael e aos professores Mario e Juliane Tanomaru pela amizade e convivência durante os anos de mestrado.

Aos amigos da Residência em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial

Que presenciei as batalhas e compartilhei tantas risadas: Ricardo Carvalho, Henrique Carioca, Marcos Dantas, Ruy Veras, Francesco da Booko, Breno Massa, Sérgio Filho e Adonai Cheim.

Aos amigos da Pós-Graduação em Dentística

Willian Kabbach, Mateus Tonetto, Prof. Marcelo Ferrarezi, Victor Clavijo, Rafael Calixto e Carol Santezi por me possibilitar ter uma visão mais abrangente da Odontologia Estética.

Aos demais amigos da Unesp e de Araraquara

Especialmente ao Alexandre, Henrique, Naia, Marcelo, Fernando, Rodrigo e Filipe. Pela amizade e companhia semanalmente.

A chácara das Garças

Que uniu alunos de pós, graduação e professores uma vez por semana para realizar partidas homéricas de futebol.

A todos os funcionários da Disciplina de Periodontia

Claudinha, Dona Maria do Rosário, Zezé, Ester, Regina Lúcia, Leandro, Priscila, Thelma, Meire, Toninho, cujo trabalho e dedicação possibilitaram a minha formação.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação

Mara, Sérgio, Rosângela, José Alexandre e Flávia, pela gentileza com que sempre me receberam, paciência, competência e por resolverem tantas dúvidas!

Ao meu mentor

Professor Glauco Rangel Zanetti pela amizade, e por me guiar durante estes últimos anos. Por ser um modelo de pessoa e de competência profissional a ser seguido. Obrigado por me mostrar que a melhora é sempre possível.

Aos meus professores de Vitória

Liliana, Liliane, Ivette, Rosa, Raquel, Eduardo, Fábio, Marcelo, Masioli, Batitucci, Judith. Que me incentivaram a sair de Vitória em busca de novos conhecimentos e aprimoramento profissional.

Ao meu tio Marcelo e minha tia Lana

Por terem me escolhido para ser o padrinho do José Henrique e pelo estímulo para que eu me aperfeiçoasse profissionalmente desde a época da minha graduação.

A família Scaf

Em especial ao Rafael, Érika e a Gulnara que pude conviver durante os últimos 3 anos e sempre me convidaram para cozinhar ou saborear pratos fantásticos.

A família Verzola

Que me recebeu em São Carlos de braços abertos em finais de semana tediosos em Araraquara e me permitiram desfrutar de seus aposentos.

Aos amigos

Luizinho, Pablito, Jonas, JP, Aloizio, Alliny, Giovana, Rubinho, Mario, Willian e Nicolau pela amizade e companheirismo.

A Raílda

Que cuida há anos da minha família em Vitória e é um amor de pessoa. Sempre fazendo com que minhas remotas idas a minha casa sejam mais confortáveis.

A todos

Pois são peças fundamentais na minha vida, sem exceções. Fernando, Luiz Henrique, José Augusto, Rodrigo, Marcelo, Guilherme, Thiago, Umberto, Raphael, Valdir, Júlia, Karine, Gabriela, Carla, Tereza, Flávia... E a todos que não foram citados anteriormente, mas fizeram/fazem parte da minha vida e a tornaram/tornam melhor.

Aos funcionários da Biblioteca

Maria Helena, Marley, Eliane, Odete, Adriano, Maria Inês, Silvia Helena e Ceres, pela atenção e excelente revisão bibliográfica.

A Deus

Simplesmente por tudo!

SUMÁRIO

Resumo.....	12
Abstract.....	15
Introdução.....	18
Revisão de Literatura.....	22
Proposição.....	47
Materiais e Métodos.....	49
Resultados.....	59
Discussão.....	74
Conclusão.....	87
Referências.....	89
Anexo.....	115

RESUMO

Borges-Filho FF. **Avaliação do tempo necessário para o restabelecimento da remodelação óssea após tratamento com bifosfonato e seu efeito sobre a osseointegração de implantes.** [Dissertação de Mestrado]; Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações no processo de remodelação óssea após a suspensão do tratamento com alendronato e sua influência sobre a osseointegração de implantes. Para isso, setenta ratas Wistar foram divididas em 2 grupos que receberam no dia 0 placebo (grupo controle-CTLE, n = 10) ou alendronato, na dose de 1 mg/kg (grupo teste, n = 60), uma vez por semana, por 120 dias. No dia 120 o tratamento com alendronato foi interrompido em 50 animais. Um implante de titânio foi instalado na metáfise tibial esquerda nos dias 0, 7, 14, 28 e 45 dias após a interrupção do tratamento (n=10 em cada período). O grupo CTLE e um grupo que continuou a receber o alendronato até o fim do experimento (grupo ininterrupto – INT, n=10) foram submetidos à cirurgia para instalação do implante no dia 120. Todos animais foram sacrificados 28 dias após a instalação dos implantes. Foram avaliados a densidade mineral óssea do fêmur e das vértebras lombares, os marcadores bioquímicos de remodelação óssea osteocalcina (OCN), propeptídeo aminoterminal do colágeno tipo I (P1NP), telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (CTX) no dia da instalação do implante e no dia do sacrifício. O tecido ósseo ao redor dos implantes foi analisado de forma descritiva, e por meio da avaliação da quantidade de tecido ósseo em contato com a superfície do implante (BIC) e da área de tecido

ósseo presente entre as roscas do implante (BAFO). Todos os grupos submetidos ao tratamento com alendronato apresentaram valores de densidade óssea significativamente maiores quando comparados ao grupo CTLE. Os marcadores de remodelação óssea apresentaram concentrações séricas menores no grupo teste, sendo que após a suspensão do tratamento com alendronato observou-se discreto aumento nos períodos iniciais de interrupção, seguido de uma nova diminuição nos períodos mais prolongados. A análise BIC não demonstrou diferenças significantes entre os grupos, porém a BAFO apresentou menores valores para o grupo 45 dias, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 0 dias. Apesar de não apresentar diferença em relação à quantidade de tecido ósseo ao redor dos implantes, a qualidade deste tecido apresenta-se aparentemente comprometida. Com base nos dados apresentados, pode-se concluir que o tratamento com alendronato diminuiu a remodelação do tecido ósseo, sem que a concentração sérica desses marcadores voltassem ao padrão do animais do grupos controle, mesmo após 73 dias da suspensão do tratamento. Apesar do tratamento com alendronato não ter demonstrado interferência na quantidade de tecido ósseo ao redor dos implantes, sua qualidade mostrou-se alterada.

Palavras-chave: Alendronato, bifosfonato, remodelação óssea, marcadores biológicos, densidade óssea, osseointegração.

ABSTRACT

Borges-Filho FF. **Evaluation of bone turnover reestablishment after bisphosphonate withdrawal and its influence on implant osseointegration** [Dissertação de Mestrado]; Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

The aim of this study was to evaluate bone turnover alterations after alendronate withdrawal and its influence on dental implants osseointegration. Seventy female Wistar rats were divided in 2 groups that received on day 0 either placebo (control group – CTLE, n = 10) or alendronate 1mg/kg (test group, n = 60) once a week for 120 days. At day 120 alendronate treatment was suspended for 50 animals. A titanium implant was placed in rats' left tibiae on days 0, 7, 14, 28 and 45 after alendronate withdrawal (n=10 for each period). CTLE group and a group that received alendronate until the end of the experimental period (non interrupted group - INT, n = 10) underwent implant placement surgery on day 120. All animals were euthanized 28 days after implant surgery. Bone mineral density (BMD) of femur and lumbar vertebrae and biochemical markers of bone turnover of serum collected on implant placement surgery's and euthanization's days were analyzed. Bone tissue around implants was submitted to descriptive analysis, bone-to-implant contact (BIC) and bone area fraction occupancy between implant threads (BAFO). All groups receiving alendronate showed higher BMD values when compared to CTLE group. Bone turnover markers presented decreased concentrations in test group. After alendronate withdrawal these values were slightly increased in the initials periods followed by another decrease in biomarkers concentrations in the late periods. No difference was

observed between groups for the BIC ratio. However group 45 days BAFO were statically significant lower than group 0 day. Although there was not difference in the bone quantity around implants, its quality was apparently compromised in the groups that received alendronate. The findings of this study demonstrated that alendronate treatment decreased bone turnover and biochemical markers did not return to CTL group values even after 73 days of alendronate withdrawal. Although alendronate treatment did not interfere with bone quantity around implants, bone quality was altered.

Key-words: Alendronate, bone turnover, biochemical markers, bone mineral density, osseointegration.

INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo altamente dinâmico e em constante remodelação, o que permite o reparo após fraturas e o suporte às demandas funcionais¹²³. É composto por osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Osteoblastos são originários de células osteoprogenitoras e têm a função de produzir a matriz osteóide, a qual será mineralizada⁵⁷. Quando estas células ficam aprisionadas na matriz óssea são consideradas como células maduras e denominadas de osteócitos¹²⁴. Já os osteoclastos, células com função de reabsorção do tecido ósseo, possuem vários núcleos e são derivadas da linhagem dos monócitos^{128,200}.

O tecido ósseo é mantido por um equilíbrio entre a formação, em grande parte mediada por osteoblastos, e a reabsorção, mediada por osteoclastos^{27,57}. Mudanças em sua biologia decorrente de alguns fatores como a deficiência estrogênica e de determinados minerais, hiperparatireoidismo e imobilização, podem interferir em sua homeostase, resultando na exacerbação da reabsorção em relação à formação óssea, levando à perda de massa^{92,105,157,158}. Diversos tratamentos têm sido propostos com a finalidade de inibir a perda contínua de massa óssea, podendo-se citar dentre estes a reposição estrogênica, os bifosfonatos (BF) e a calcitonina^{23,56,65,99}.

Os bifosfonatos (BF) são drogas que possuem o potencial de alterar a biologia do tecido ósseo, diminuindo severamente a taxa de remodelação. Este medicamento atua em nível celular promovendo apoptose dos osteoclastos ou impedindo sua efetiva função^{150,173,202}. A inibição do processo de reabsorção óssea também promove alterações na formação óssea, já que ambos estão interligados.

São utilizados para o tratamento de diversas patologias ósseas, dentre elas o mieloma múltiplo, doença de Paget, hipercalcemia maligna, tumores com metástases ósseas, osteogênese imperfeita, displasia fibrosa e osteoporose/osteopenia^{43,64,170,192}. O controle de tais

patologias se mostra efetivo, uma vez que seu uso resulta em redução da perda de massa óssea, aumento da densidade mineral e redução de fraturas^{22,42,129}.

Por outro lado, o uso prolongado dos BF pode suprimir severamente a reabsorção óssea, prejudicando o processo de remodelação⁶⁶. Por possuir um efeito cumulativo no tecido ósseo e pela difícil eliminação pelo organismo, os BF promovem com o tempo uma verdadeira estagnação do processo de remodelação óssea^{143,156}. A severa inibição deste processo pode provocar graves consequências, existindo relatos de pacientes que, após uso prolongado desses medicamentos, apresentaram lesões osteonecróticas nos maxilares de difícil tratamento^{140,146,148} ou fraturas atípicas de fêmur^{4,125,155,163}.

A taxa de remodelação óssea pode ser avaliada por meio de testes bioquímicos realizados no soro, plasma e urina¹⁸⁹. A reabsorção óssea pode ser medida avaliando os níveis de telopeptídeo aminoterminal do colágeno tipo I (NTX), telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (CTX), piridinolina e deoxipiridinolina (DPD)^{10,181}. Os marcadores mais utilizados para avaliação da formação óssea são fosfatase alcalina óssea, osteocalcina e o propeptídeo aminoterminal do colágeno tipo I (P1NP)^{46,55,107}.

O efeito residual do medicamento depende do tipo de BF utilizado, o qual irá influenciar na velocidade com que o processo de remodelação óssea retornará ao normal¹⁶⁴. Estudos em humanos, que avaliaram marcadores sistêmicos de reabsorção óssea, demonstraram que após cinco anos da retirada do alendronato houve aumento de 29,6% nos níveis de NTX e 55,6% nos níveis de CTX²³.

Mesmo necessitando um longo período para sua eliminação, alguns autores afirmam que o processo de remodelação óssea é retomado após a interrupção do tratamento^{132,180}. Porém não existe um consenso sobre o tempo necessário para que haja o retorno aos níveis

normais de remodelação, de forma a evitar possíveis efeitos adversos frente a intervenções na cavidade oral. Além disso, existem poucos estudos que empregaram marcadores bioquímicos de formação e reabsorção óssea na avaliação da normalização do processo de remodelação óssea e do processo de osseointegração de implantes.

REVISÃO DE LITERATURA

BIFOSFONATOS

Os bifosfonatos (BF) são medicamentos amplamente utilizados para o tratamento de patologias ósseas, com comprovada eficácia terapêutica por possuírem um potente efeito sobre o processo de reabsorção óssea (Liberman et al.¹²⁹, 1995; Black et al.²³, 2006; Russel et al.¹⁸⁰, 2008).

Fisiologicamente o organismo humano produz substâncias similares aos BF, encontradas em fluidos corporais como plasma e urina (Fleisch, Bisaz⁷⁵, 1962; Russel et al.¹⁷⁸, 1971). O ácido pirofosfórico, por exemplo, é uma substância endógena encontrada no organismo na forma de pirofosfato, que possui a função de inibir naturalmente a reabsorção óssea mediada por osteoclastos. Entretanto, sua utilização como agente terapêutico é restrita por sofrer rápida hidrólise enzimática, principalmente quando administrado por via oral (Schibler et al.¹⁸⁶, 1968). Em vista disso, foram elaborados análogos sintéticos do pirofosfato, os BF, os quais possuem maior potência, afinidade de ligação com a hidroxiapatita e alta resistência à degradação (Nancolas et al.¹⁵², 2006).

Diversas alterações da cadeia química do pirofosfato foram inicialmente realizadas para a obtenção de um fármaco mais estável e que possuísse o potencial de diminuir a reabsorção óssea (Russel et al.¹⁷⁹, 1970; Fleisch et al.⁷⁷, 1968; Widler et al.²⁰⁸, 2002). O átomo central da molécula do pirofosfato é o oxigênio, enquanto que o BF possui uma estrutura fosfato-carbono-fosfato (P-C-P). Este átomo possui quatro elétrons o que permite sua ligação com mais duas cadeias, R1 e R2 (Russel et al.¹⁸⁰, 2008; Van beek²⁰² et al., 2003), que podem variar e que irão determinar, respectivamente, a afinidade de ligação do BF com o tecido e sua potência. Estas mudanças conferiram à droga uma maior resistência à degradação, aumentando a duração do seu efeito e a capacidade de alterar o metabolismo ósseo (Ponte Fernandez et al.¹⁶⁶, 2006).

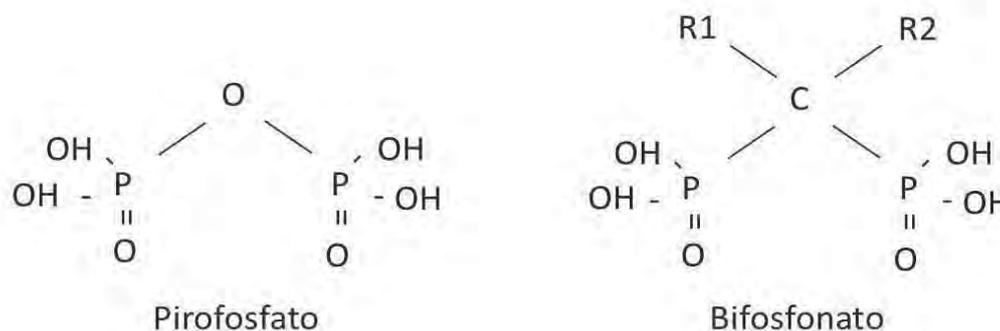


FIGURA 1 – Fórmula molecular do pirofosfato e geral dos bifosfonatos (Ponte Fernandez et al., 2006).

Além disso, a presença da cadeia P-C-P permite que diversos fármacos sejam produzidos a partir de alterações nas cadeias laterais de carbono ou pela esterificação do grupamento fosfato (Russel, et al.¹⁸⁰, 2008). Estes fármacos podem ser divididos em duas classes: não-nitrogenados e nitrogenados.

⇒ **Bifosfonatos não-nitrogenados**

Estes medicamentos não apresentam nitrogênio na cadeia R2 e são menos potentes. Seu metabolismo produz o composto AppCH₂p que possui uma cadeia P-C-P e é um metabólito análogo à adenosina trifosfato (ATP) (Rogers et al.¹⁷⁴, 1994). Em contraste à molécula de ATP, esse metabólito é resistente à hidrólise com a liberação do íon fosfato, interferindo na produção de energia celular. O AppCH₂p se acumula no meio intracelular dos osteoclastos e compete com o ATP no metabolismo de energia celular, levando o osteoclasto ao processo de apoptose, o que resulta na diminuição da reabsorção óssea (Frith et al.⁸², 1997; Hiroi-Furuya et al.¹¹⁰, 1999). Por ser absorvido seletivamente pelos osteoclastos, o processo de apoptose ocorre apenas nessas células, preservando as demais células do tecido ósseo (Rogers et al.¹⁷³, 2011).

Para exercer ação efetiva em caso de tumores com metástases ósseas é necessária uma alta dose da medicação, injetada lentamente por longos períodos de tempo, evitando danos renais ao paciente (Ponte Fernandez et al.¹⁶⁶, 2006). Por serem pouco potentes e apresentarem efeitos colaterais têm pouca aplicabilidade clínica. Exemplos desta classe de BF são o etidronato, clodronato e tiludronato.

⇒ **Bifosfonatos nitrogenados**

São medicamentos que possuem nitrogênio em sua cadeia R2 e são potentes inibidores da reabsorção óssea, agindo no metabolismo ósseo por meio da inibição da via do mevalonato. Esta classe de medicamento se liga e bloqueia a enzima farnesil difosfato sintase (FDPS), impedindo a formação de lipídios isoprenóides como o farnesol difosfato (FPP) e o geranylgeraniol difosfato (GGPP). Estes metabólitos são essenciais para a modificação pós-traducional (prenilação) de algumas proteínas (Van Beek et al.²⁰², 2003; Van Beek et al.²⁰¹, 1999). A inibição da prenilação interfere na função de algumas proteínas ao prejudicar sua ancoragem à membrana celular e afetar a interação proteica. As proteínas predominantemente afetadas por este processo são as pequenas GTPases que se ligam ao GGPP, como das famílias Rab, Cdc42, Rac, Rho e Ras. Estas são importantes proteínas sinalizadoras que regulam uma série de eventos celulares necessários para a função osteoclástica (Rogers et al.¹⁷³, 2011). A ausência da prenilação das proteínas das famílias Rho, Rac e Cdc42 pode levar à eliminação das projeções osteoclásticas (Sato, Grasser¹⁸³, 1990) e alteração de seu citoesqueleto com perda dos anéis de actina (Ory¹⁵⁹ et al., 2008), enquanto que a alteração das GTPases Rab promove modificação na regulação do movimento de vesículas citoplasmáticas necessárias para a função osteoclástica (Coxon, Rogers⁴⁵, 2003; Pavlos¹⁶² et al., 2005). A inibição das vias de sinalização necessárias para

a sobrevivência celular e a ausência da preilação de pequenas GTPases, como da família Rac, são as vias que levam à apoptose do osteoclasto quando exposto a altas concentrações de BF. O bloqueio da enzima FDPS também leva ao acúmulo de isopentil pirofosfato (IPP) que gera a produção de um metabólito análogo ao ATP, a adenosina metril-trifosfato (Apppl), e pode levar o osteoclasto à apoptose (Monkkonen et al.¹⁵⁰, 2006). De maneira geral, os BF-nitrogenados diminuem a reabsorção óssea por interferir com a função e sobrevivência celular (Ito et al.¹¹⁴, 1998; Breuil et al.³², 1998), a osteoclastogênese (Boonekamp et al.²⁸, 1986; Lowik et al.¹³⁶, 1988) e a dinâmica citoesquelética (Murakami et al.¹⁵¹, 1995). Estes medicamentos possuem ação dose dependente e apresentam maior potência e aplicabilidade clínica quando comparados aos BF não nitrogenados. São utilizados para o tratamento do mieloma múltiplo, doença de Paget, hipercalcemia maligna, tumores com metástases ósseas, osteogênese imperfeita, displasia fibrosa e osteoporose/osteopenia (Reid, Hosking¹⁷⁰, 2011; Eastell et al.⁶⁶, 2011; Silverman¹⁹², 2011; Coleman, McCloskey⁴³, 2011), e seu uso vem aumentando, assim como novos tipos de BF desta classe são produzidos. Os BF nitrogenados mais comumente utilizados são alendronato, ibandronato e risedronato, por via oral, e pamidronato e ácido zoledrônico, por via endovenosa.

ALENDRONATO

O alendronato (4-amino-1-hidroxybutyidene) é um representante da terceira geração de bifosfonatos e o mais utilizado atualmente para o tratamento da osteoporose, embora outros BF nitrogenados, administrados por via oral, também sejam utilizados. Os primeiros compostos, tais como o etidronato, promoviam defeito na mineralização óssea, comprovado por estudos clínicos e experimentais (Fleisch et al.⁷⁸, 1969, Masarachia et al.¹⁴², 1996). A introdução do radical

amina fez com que o alendronato ganhasse característica especial para o uso clínico quando comparado aos compostos iniciais (Schenk¹⁸⁵, 1996). A droga pode ser tomada diária, semanal ou mensalmente, dependendo da dose utilizada.

A osteoporose é a perda de massa óssea esquelética que pode facilitar a ocorrência de fraturas, principalmente de quadril e coluna (Eastell⁶², 2003). É mais comum em mulheres numa proporção de 4:1 em relação aos homens, devido ao fato que com o avanço da idade e o início da menopausa a produção de estrógeno diminui. Uma vez que esse hormônio ajuda a manter o equilíbrio entre a reabsorção e formação óssea (Consensus Development Conference on Osteoporosis², 1993), sua redução leva ao predomínio da reabsorção e, conseqüentemente, à diminuição da densidade óssea, principalmente nos primeiros cinco anos após o início da menopausa (Harada, Rodan¹⁰⁵, 2003).

Devido às complicações decorrentes do emprego da terapia de reposição hormonal, esta foi desencorajada e o alendronato foi considerado uma alternativa de tratamento, pela capacidade de redução da ocorrência de fraturas em pacientes com osteoporose (Lieberman et al.¹²⁹, 1995; Cummings et al.⁵¹, 1998; Black et al.²¹, 1996).

EFEITO DOS BIFOSFONATOS SOBRE A REMODELAÇÃO ÓSSEA: ALTERAÇÕES CELULARES

Os BF são seletivamente absorvidos pelo tecido ósseo, ligando-se principalmente à hidroxiapatita presente na lacuna de reabsorção. Durante o processo de reabsorção óssea os BF são internalizados pelos osteoclastos, por meio de endocitose, onde realizam suas principais funções (Russel¹⁷⁷, 2011).

Apesar dos BF diminuírem a taxa de remodelação óssea corpórea com conseqüente redução da incidência de fraturas e perda de

massa óssea, seu uso em altas doses por um período prolongado pode levar a uma alta supressão da remodelação óssea, o que prejudicaria as propriedades mecânicas do osso, aumentando a quantidade de microfraturas e de fraturas atípicas (Mashiba et al.¹⁴³, 2000; Odvina et al.¹⁵⁶, 2005). A fratura atípica femoral subtrocantérica e da diáfise foram relatadas em pacientes sob tratamento com BF por períodos prolongados, sendo relacionadas à severa inibição da remodelação óssea, considerada prejudicial ao processo contínuo de reparo ósseo (Odvina et al.¹⁵⁵, 2010; Koh et al.¹²⁵, 2010; Pazianas, Abrahmsen¹⁶³, 2011; Allen, Burr⁴, 2011).

A diminuição da taxa de remodelação pelos BF além de inibir o processo de reabsorção óssea também provocaria um desequilíbrio no processo de formação, alterando osteoblastos (Idris et al.¹¹³, 2008; Pozzi et al.¹⁶⁷, 2009). Por outro lado, estudos mostraram que estes fármacos não alteram a capacidade dos osteoblastos de produzir matriz osteóide (Feher et al.⁷¹, 2010, Allen et al.⁵, 2006, Allen, Burr⁴, 2011), embora a qualidade do tecido ósseo neoformado e o recrutamento de osteoblastos e células precursoras hematopoiéticas possam estar prejudicados (Ward et al.²⁰⁵, 2011; Zhao et al.²¹⁵, 2010).

Diversos estudos demonstraram funções opostas dos BF sobre os osteoblastos, sendo que alguns relatam estímulo à proliferação (Giuliani et al.⁹⁴, 1998; D'aoust et al.⁵², 2000; Frediani et al.⁸¹, 2004) enquanto outros relatam inibição (Idris et al.¹¹³, 2008; Pozzi et al.¹⁶⁷, 2009). Segundo Bellido, Plotkin¹⁶ (2011), os estímulos de crescimento e proliferação sobre os osteoblastos ocorrem quando a concentração do BF varia entre 10^{-9} M a 10^{-6} M enquanto os efeitos inibitórios ocorrem quando existem concentrações da droga maiores que 10^{-5} M. Outros autores relataram que a administração de BF resultou no aumento da espessura do tecido ósseo e elevação do número de osteoblastos em atividade (Balena et al.¹³, 1993; Chavassieux et al.³⁹, 1997), no aumento da taxa de formação óssea (Recker et al.¹⁶⁹, 2008) e na prevenção da apoptose de

osteoblastos e osteócitos induzida por corticóides (Plotkin et al.¹⁶⁵, 2006; Bellido, Plotkin¹⁶, 2011).

O efeito dos BF sobre a mineralização é ainda controverso. Inicialmente foi constatado que o pirofosfato possuía a capacidade de inibir a mineralização (Fleisch, Neuman⁷⁶, 1961). De maneira similar os BF possuem a capacidade de inibir a dissolução de cristais de hidroxiapatita e a agregação e formação de cristais de fosfato de cálcio, além de inibir a calcificação, demonstrada tanto em estudos *in vitro* como em animais (ratos) (Fleisch et al.⁷⁹, 1970; Schenk et al.¹⁸⁵, 1986; Tamura et al.¹⁹⁸, 2007; Fischer et al.⁷³, 2011; Russel¹⁷⁷, 2011). Entretanto, outros estudos em animais mostraram que, em defeitos realizados em fêmur e tíbia, a cicatrização óssea foi considerada normal (Bauss et al.¹⁴, 2004; Little et al.¹³⁴, 2005). Segundo Fuchs et al.⁸⁵ (2011) tanto a taxa de mineralização primária como a secundária não são alteradas pelo uso do BF, sendo o aumento da mineralização do tecido ósseo atribuído à supressão da reabsorção e não à alteração da mineralização. Alterações na remodelação óssea podem ser mensuradas por meio de testes bioquímicos que detectam compostos liberados após a reabsorção ou formação óssea (Eastell et al.⁶⁶, 2011; Wasnich et al.²⁰⁶, 2004; Iwamoto et al.¹¹⁵, 2009). Valores demasiadamente baixos destes marcadores são considerados de alto risco para o desenvolvimento de complicações, demonstrando a importância de seu controle (Lipton et al.¹³³, 2008; Marx et al.¹⁴¹, 2007).

MARCADORES BIOQUÍMICOS DE AVALIAÇÃO DA REMODELAÇÃO ÓSSEA

Exames que quantificam e verificam a taxa de remodelação do tecido ósseo são importantes para o controle dos pacientes em uso de BF (Lipton et al.¹³³, 2008; Brown et al.³³, 2005; Singer, Eyren¹⁹³, 2008). Embora os marcadores bioquímicos de remodelação óssea possam variar

entre diferentes populações e indivíduos, estes são considerados de grande valia para avaliação desse processo (Hannon, Eastell¹⁰³, 2000; Finklestein et al.⁷², 2002). Para determinar os níveis de formação óssea, marcadores como a osteocalcina, a fosfatase alcalina óssea e o propeptídeo aminoterminal do colágeno tipo I (P1NP) são geralmente utilizados (Crandall et al.⁴⁶, 2011; Delmas et al.⁵⁵, 2009; Harris et al.¹⁰⁷, 1993). Já para determinação dos marcadores de reabsorção óssea são utilizados ensaios enzimáticos para detecção de piridinolina, deoxipiridinolina (DPD), telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (CTX) e telopeptídeo aminoterminal do colágeno tipo I (NTX) (Saag et al.¹⁸¹, 2007; Astrom et al.¹⁰, 2010).

⇒ **Marcadores de formação óssea**

Os marcadores de formação óssea são avaliados no soro e demonstram a função dos osteoblastos durante a deposição do tecido ósseo. Estes marcadores são produtos de osteoblastos em atividade (Cooper et al.⁴⁴, 2005).

A fosfatase alcalina total é uma enzima localizada na membrana de diversas células estando envolvida no processo de formação de tecido osteóide e de mineralização (Harris¹⁰⁶, 1990; Crofton⁵⁰, 1982; Singer, Eyren¹⁹³, 2008). A avaliação seletiva da fosfatase alcalina óssea, presente na superfície de osteoblastos, permite identificar a quantidade da enzima que está sendo produzida pelas células ósseas durante o processo de mineralização, sendo um teste de preferência por demonstrar maior especificidade (Magnusson et al.¹³⁸, 1999; Farley et al.⁷⁰, 1981).

A osteocalcina é um marcador específico de função osteoblástica sendo uma proteína liberada durante o processo de mineralização (Gundberg, Nishimoto¹⁰², 1999; Chen et al.⁴⁰, 1996; Wolf²¹⁰,

1996). Logo após sua síntese esta se liga à matriz extracelular do tecido ósseo, sendo que apenas uma pequena fração entra em contato com a corrente sanguínea, onde pode ser detectada por meio de ensaios imunoenzimáticos (Parvianen et al.¹⁶¹, 1994; Seibel¹⁸⁹, 2005).

O propeptídeo aminoterminal do colágeno tipo I (P1NP) é uma proteína rica em prolina e hidroxiprolina (Merry et al.¹⁴⁷, 1976), secretada por osteoblastos durante o processo de deposição de matriz, sendo considerada de grande valia para o diagnóstico de doenças osteometabólicas (Marin et al.¹³⁹, 2011; Liu et al.¹³⁵, 1995). Após sua secreção no meio extracelular esta é clivada e liberada na circulação sanguínea (Tahtela, Tholix¹⁹⁷, 1996; Seibel¹⁸⁹, 2005). Sua dosagem reflete a quantidade de colágeno tipo 1 sendo produzido no organismo. Apesar de outros tecidos também produzirem essa proteína em mínimas quantidades, o tecido ósseo é o maior responsável pela sua liberação devido a sua alta taxa de remodelação (Singer, Eyren¹⁹³, 2008; Eastell et al.⁶⁴, 2011).

⇒ **Marcadores de reabsorção óssea**

Estes marcadores avaliam, no soro e/ou urina, fragmentos do colágeno liberados após reabsorção óssea. Durante o processo de reabsorção óssea, os osteoclastos liberam uma mistura de proteases ácidas e neutras que desestruturam as fibras de colágeno, quebrando-as em pequenos fragmentos, os quais podem ser detectados, por meio de testes bioquímicos, no sangue e na urina (Cremers, Farooki⁴⁷, 2011).

Piridinolina e deoxipiridinolina (DPD) são aminoácidos que fortalecem as fibras de colágeno presentes na matriz extracelular. Durante o processo de reabsorção óssea pelos osteoclastos, a degradação do colágeno maduro libera esses marcadores no soro e na urina (Eastell et al.⁶³, 1997; Kraenlitz, Seibel¹²⁶, 1999). Ao contrário da

piridinolina, a DPD é encontrada majoritariamente em ossos e dentina, sendo considerada como um marcador de reabsorção óssea seletiva (Tamura et al.¹⁹⁸, 2007).

O telopeptídeo aminoterminal do colágeno tipo I (NTX) e o telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (CTX) são encontrados especificamente no tecido ósseo e são derivados de regiões específicas da molécula de colágeno tipo I, respectivamente da porção aminoterminal (Hanson et al.¹⁰⁴, 1992; Woitge et al.²⁰⁹, 1999) e carboxiterminal (Bonde et al.²⁵, 1994, Fledelius et al.⁷⁴, 1997). Estes são liberados na circulação e na urina após quebra do colágeno pelos osteoclastos, são específicos do tecido ósseo e não são metabolizados pelo organismo, o que os tornam marcadores efetivos na avaliação da reabsorção óssea (Peris et al.¹⁶⁴, 2011; Seibel¹⁸⁹, 2005).

O tratamento sistêmico com BF reduz os níveis tanto dos marcadores de reabsorção (DPD, CTX, NTX) como de formação óssea (fosfatase alcalina total e óssea, osteocalcina e P1NP) (Da Paz et al.⁵³, 2001; Iwamoto et al.¹¹⁵, 2009; Grey et al.¹⁰⁰, 2009; Grey et al.⁹⁹, 2010; Yoshimura et al.²¹⁴, 2011). A alteração do processo de remodelação óssea realizada pelo medicamento e evidenciada pelos marcadores citados resulta no efetivo controle da perda de massa óssea e diminuição da incidência de fraturas (Lieberman et al.¹²⁹, 1995; Black et al.²², 2007; Chestnut et al.⁴¹, 2004).

DURAÇÃO DO EFEITO DO BIFOSFONATO E ALTERAÇÕES APÓS A RETIRADA DA MEDICAÇÃO

O tratamento com BF geralmente é realizado por diversos anos pela necessidade de controlar, a longo prazo, o metabolismo ósseo alterado. Por esse motivo, a supressão severa do processo de remodelação óssea pode ocorrer e prejudicar os pacientes em uso dos

BF. Entretanto, não existe um consenso sobre o tempo máximo de tratamento, embora alguns estudos tenham reavaliado sua necessidade após cinco anos de tratamento, em pacientes com osteoporose (Bone et al.²⁶, 2004; Black et al.²³, 2006; Masud¹⁴⁴, 2009; Eastell et al.⁶⁴, 2011).

Os BF possuem um efeito duradouro sobre o tecido ósseo, uma vez que a predileção e possibilidade de recaptção por este tecido permitem que haja um efeito residual do medicamento. A eliminação dos BF é dificilmente realizada, sendo excretado pela urina sem sofrer alteração, após filtração glomerular (Russel et al.¹⁸⁰, 2008, Mitchell et al.¹⁴⁹, 2000; Saha et al.¹⁸², 1994).

A maior parte do medicamento que entrou em contato com o tecido ósseo se liga especificamente à hidroxiapatita presente na lacuna óssea de reabsorção, podendo ser incorporado ao tecido após a deposição de matriz óssea (Lin¹³⁰, 1996; Russel et al.^{177, 180}, 2011). O medicamento pode ser liberado do tecido após a reabsorção óssea, onde pode novamente ligar-se à hidroxiapatita, ser endocitado pelos osteoclastos ou alcançar a circulação sanguínea (Berenson et al.¹⁷, 1997; Drake, Cremers⁶⁰, 2010). Apesar de alguns autores estimarem que a eliminação completa do BF demore mais de 10 anos (Lin et al.¹³², 1999; Rodan et al.¹⁷², 2004; Nancollas et al.¹⁵², 2006), o tempo necessário para sua eliminação e retorno do processo de remodelação óssea ainda é incerto, sendo necessários estudos que determinem esse período (Cremers, Papapoulos⁴⁸, 2011).

Mesmo um ano e meio após a interrupção do tratamento com alendronato, um efeito residual sobre o processo de remodelação óssea ainda pode ser verificado (Peris et al.¹⁶⁴, 2011). A completa excreção do BF e conseqüente eliminação da atividade dependerá principalmente do tipo e dose do medicamento utilizado e da patologia que o paciente apresenta (Saag et al.¹⁸¹, 2007; Eastell et al.⁶⁴, 2011; Grey et al.¹⁰⁰, 2009; Grey et al.⁹⁹, 2010). Por exemplo, a eliminação de uma

infusão endovenosa de 75 mg de pamidronato será mais rápida em pacientes com hipercalcemia maligna ou com tumores ósseos do que em pacientes com osteoporose ou doença de Paget (Cremers, Papapoulos⁴⁸, 2011). Entretanto, modelos de estudos para avaliação do tempo de ação dos BF no tecido ósseo são falhos por não determinarem, a curto e longo prazo, a concentração da droga no tecido, seu efeito e tempo de atuação (Cremers et al.⁴⁹, 2005).

Greenspan et al.⁹⁸ (2002) avaliaram em pacientes com osteoporose tratados por meio de reposição hormonal com estrógeno, com alendronato ou pela combinação de ambos por dois anos, o efeito da interrupção do tratamento. Após esse período uma parcela dos pacientes de cada grupo teste teve seu tratamento substituído por placebo. Os pacientes que receberam alendronato e que tiveram o tratamento interrompido tiveram resultados da densidade óssea mineral maior quando comparados aos que receberam o estrógeno de maneira semelhante. A análise dos marcadores de remodelação óssea NTX e fosfatase alcalina óssea demonstraram o aumento nos níveis destes marcadores após a interrupção do tratamento, demonstrando a retomada do processo de remodelação óssea.

Wasnich et al.²⁰⁶ (2004) realizaram por 6 anos um estudo clínico controlado por placebo, cego, aleatorizado e multicêntrico com o objetivo de comparar as alterações na densidade óssea mineral e no processo de remodelação óssea em pacientes tratadas com alendronato ou reposição hormonal que tiveram seu tratamento interrompido. As pacientes foram divididas em grupos que receberam placebo por 6 anos ou alendronato por, no mínimo dois, e, no máximo, seis anos. Foi verificado que a densidade mineral óssea foi diminuída proporcionalmente ao tempo de interrupção do tratamento, enquanto que os níveis do marcador de reabsorção óssea NTX aumentaram nos grupos que tiveram a terapia com alendronato ou reposição hormonal interrompida.

Entretanto, o retorno do processo de reabsorção óssea ocorreu mais lentamente nos grupos tratados com alendronato.

Bone et al.²⁶ (2004) realizaram um estudo clínico aleatorizado, multicêntrico, duplo-cego e controlado por placebo para avaliação do efeito da terapia prolongada (10 anos) com alendronato e de sua interrupção após cinco anos. Foi constatado que a interrupção do tratamento com alendronato levou à diminuição na densidade mineral óssea e aumento dos marcadores de remodelação óssea, NTX e fosfatase alcalina óssea. Contudo, a manutenção ou interrupção do tratamento com alendronato não influenciou na incidência de novas fraturas.

Black et al.²³ (2006) avaliaram pacientes com osteoporose que foram tratados com alendronato por 5 anos e que, após esse período, tiveram seu tratamento continuado ou receberam placebo por mais 5 anos. Todos os pacientes do estudo receberam suplementação com cálcio e vitamina D durante os dez anos. Nos cinco anos iniciais do estudo os pacientes receberam tratamento com alendronato. Após esse período os pacientes foram divididos em três diferentes grupos: tratamento diário com 5 mg de alendronato, com 10 mg de alendronato ou placebo. Nesses pacientes foi analisada a densidade mineral óssea, marcadores bioquímicos de remodelação óssea e incidência de fraturas. A interrupção do tratamento (grupo placebo) com alendronato levou à diminuição da densidade mineral óssea do quadril e coluna vertebral, mas não a um aumento significativo na incidência de fraturas. Foi constatado ainda um aumento de 55,6%, 59,5% e 28,1%, respectivamente, nos níveis de CTX, P1NP e de fosfatase alcalina óssea.

Fuchs et al.⁸⁶ (2008) avaliaram o tempo necessário para o restabelecimento do processo de remodelação óssea em ratas Sprague-Dawley submetidas à ovariectomia, tratadas com alendronato ou risedronato, que tiveram seu tratamento interrompido após 8 semanas. Os

animais do grupo teste foram sacrificados nos períodos de 0, 4, 8, 12 e 16 semanas após a interrupção do tratamento. Os resultados demonstraram que o tratamento com BF diminuiu os índices de remodelação óssea de maneira significativa e que a taxa de aposição óssea permaneceu diminuída até 12 semanas após a interrupção dos medicamentos. Após 16 semanas da descontinuidade do risedronato a taxa de formação óssea na tíbia foi restabelecida, fato este que não ocorreu nos animais tratados com alendronato. Foi demonstrado que o alendronato possui um efeito residual e maior retenção no tecido ósseo quando comparado ao risedronato.

Peris et al.¹⁶⁴ (2011) realizaram um estudo transversal em mulheres que haviam utilizado alendronato ou risedronato para tratamento da osteoporose por aproximadamente 4 anos e 6 meses e que fora interrompido. A relação entre a excreção renal dos BF e marcadores de remodelação óssea, tempo de exposição aos BF e tempo da interrupção do tratamento foi avaliada. Ao contrário do risedronato que não foi detectado na urina de nenhum paciente, o alendronato esteve frequentemente presente nos pacientes que tiveram seu tratamento interrompido, até 19 meses após. O aumento dos níveis do marcador de reabsorção óssea NTX foi correlacionado com o tempo de descontinuidade da droga. Mesmo com a interrupção do tratamento com alendronato foi possível notar um efeito residual do medicamento, que foi atribuído a sua grande afinidade de ligação à hidroxiapatita.

Shahnazari et al.¹⁹⁰ (2011) avaliaram em ratas Sprague-Dawley ovariectomizadas o efeito do alendronato, paratormônio e o raloxifeno sobre a qualidade e resistência do tecido ósseo após a interrupção do tratamento. Os animais foram tratados com os diferentes medicamentos por quatro semanas e foram sacrificados nos períodos de 0, 4 e 8 meses após o fim do tratamento. Os tratamentos com alendronato e raloxifeno resultaram em aumento do volume ósseo cortical, entretanto

somente o tratamento com alendronato manteve o volume ósseo adquirido. A avaliação do marcador de reabsorção óssea DPD demonstrou que o grupo que recebeu alendronato apresentou ao fim do tratamento valores inferiores aos animais submetidos à cirurgia fictícia, enquanto que após a interrupção da medicação não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos quanto aos níveis do marcador. Os testes mecânicos demonstraram aumento da resistência após o fim dos tratamentos e manutenção dos resultados após a interrupção da droga, para os grupos alendronato e paratormônio.

A maioria dos estudos relatados demonstra que a probabilidade de ocorrer novas fraturas, em um período de até cinco anos da interrupção da terapia com bifosfonato, é mínima e que há o retorno à remodelação óssea, geralmente suprimida durante a fase ativa de tratamento (Peris et al.¹⁶⁴, 2011; Shahnazari et al.¹⁹⁰, 2011; Fuchs et al.⁸⁶, 2008; Black et al.²³, 2006; Bone et al.²⁶, 2004; Wasnich et al.²⁰⁶, 2004; Greenspan et al.⁹⁸, 2002). Apesar disso, o tempo necessário para que haja um efetivo retorno às condições de remodelação ainda é incerto. Adicionalmente, estudos afirmam que a interrupção do tratamento deve ser realizada, principalmente, quando ocorrem complicações devido à severa supressão do processo de remodelação óssea (Marx et al.¹⁴¹, 2007; Armamento-Villareal et al.⁸, 2009; Aspenberg et al.⁹, 2010).

IMPLICAÇÕES DO USO DE BIFOSFONATOS NA ODONTOLOGIA

O profissional da área odontológica deve conhecer os efeitos que os BF exercem sobre os tecidos da cavidade oral. Diversas especialidades odontológicas atuam direta ou indiretamente sobre o tecido ósseo e a alteração do processo de remodelação óssea, assim como a diminuição da vascularização, promovida pelo medicamento podem acarretar em complicações frente a procedimentos invasivos

(Goss⁹⁵, 2008; Madrid, Sanz¹³⁷, 2009; Ruggiero et al.¹⁷⁶, 2009; Borromeo et al.²⁹, 2011).

Alguns estudos avaliaram o efeito da droga sobre o nível de inserção clínica e a perda óssea periodontal. Resultados positivos foram relatados quando a droga foi utilizada em pacientes portadores de doença periodontal, com melhora no nível de inserção clínica, menor reabsorção óssea e menor formação de cálculo dentário (Binderman et al.¹⁹, 2000; Jeffcoat¹¹⁶, 2006).

Na implantodontia, o uso de BF demonstrou a inibição da reabsorção de enxertos ósseos autógenos e menor reabsorção do osso alveolar após o descolamento de retalhos mucoperiosteais (Kaynak et al.¹¹⁹, 2000; Altundal et al.⁶, 2007; Yaffe et al.²¹¹, 1997). Em animais foi constatado que o tratamento com BF aumenta tanto a densidade óssea ao redor de implantes como o torque necessário para sua remoção (Giro et al.⁹³, 2007; Giro et al.⁹², 2008). Entretanto, a qualidade do tecido ósseo e a capacidade de remodelação devido a constantes forças distribuídas ao redor do implante é extremamente discutida e ainda não há comprovação da estabilidade dos resultados a longo prazo.

OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES E USO DE BIFOSFONATOS

Por afetar a remodelação óssea, os BF podem provocar alterações na osseointegração de implantes de titânio (Ruggiero et al.¹⁷⁶, 2009). Diversos estudos foram realizados com o objetivo de avaliar os efeitos dessa classe de medicamentos sobre a osseointegração.

⇒ Estudos em animais

Narai, Nagahata¹⁵³ (2003) verificaram os efeitos do alendronato sobre o torque de remoção de implantes de titânio comercialmente puro instalados em ratas com osteoporose induzida por

ovariectomia. Os animais foram alocados em três grupos de estudo: cirurgia fictícia, ovariectomia e ovariectomia + alendronato. Quatro semanas após a cirurgia de ovariectomia, os implantes foram instalados na metáfise do fêmur e foi iniciado o tratamento com alendronato, o qual foi mantido por 30 dias até o sacrifício dos animais. Os resultados demonstraram valores de torque de remoção significativamente superiores para os animais tratados com alendronato em comparação ao grupo de animais ovariectomizados. Essa diferença, entretanto, não foi significativa quando esse grupo foi comparado ao de cirurgia fictícia.

Kurth et al.¹²⁷ (2005) avaliaram, em ratas ovariectomizadas, o uso de ibandronato sobre a capacidade de osseointegração de implantes usinados ou com superfície tratada com hidroxiapatita. O tratamento com bifosfonato foi iniciado no mesmo dia em que os implantes foram instalados no fêmur dos animais, os quais foram divididos em grupos: cirurgia fictícia, de ovariectomia e ovariectomia + ibandronato por quatro semanas. Os resultados demonstraram maior percentual de contato osso/implante para o grupo tratado com BF em comparação aos demais grupos para ambas as superfícies utilizadas.

Eberhardt et al.⁶⁷ (2005) verificaram o efeito de duas diferentes doses diárias de ibandronato sobre a osseointegração de implantes, usinados ou com superfície tratada com hidroxiapatita, instalados nos fêmures de ratas Sprague-Dawley. O tratamento com solução salina, ibandronato (1µg/kg) e ibandronato (25µg/kg) foi iniciado no dia da cirurgia para instalação dos implantes. As diferentes superfícies testadas não influenciaram significativamente na osseointegração dos implantes. O grupo de animais que recebeu ibandronato 25µg/kg demonstrou melhores resultados histomorfométricos quando comparados aos grupos que receberam a droga em menor dose ou solução salina.

Duarte et al.⁶¹ (2005) avaliaram em ratas Wistar o efeito do tratamento com alendronato e estrógeno, durante todo ou parte do

período experimental, sobre a osseointegração de implantes. Os animais foram alocados em 6 grupos: cirurgia fictícia, ovariectomia, ovariectomia + alendronato por 80 dias, ovariectomia + alendronato por 40 dias, ovariectomia + estrógeno por 80 dias e ovariectomia + estrógeno por 40 dias. Os grupos alendronato, cirurgia fictícia e estrógeno por 80 dias apresentaram resultados de contato osso/implante, área óssea e densidade óssea significativamente melhores em comparação aos demais grupos.

Giro et al.^{93,92} (2007; 2008) avaliaram em ratas Wistar ovariectomizadas, a influência da deficiência estrogênica e do tratamento com alendronato e estrógeno sobre o torque de remoção e a densidade óssea radiográfica ao redor de implantes instalados na tíbia. No grupo de animais apenas ovariectomizados o torque de remoção foi estatisticamente menor quando comparado aos grupos controle, cirurgia fictícia, ovariectomia + estrógeno e ovariectomia + alendronato. Em contrapartida, os animais que foram submetidos à ovariectomia e receberam tratamento com alendronato apresentaram torque de remoção e densidade óssea significativamente maior quando comparados aos demais grupos.

Viera-Negrón et al.²⁰³ (2008) avaliaram a osseointegração de implantes instalados em maxilas de ratas Sprague-Dawley submetidas à ovariectomia e tratadas ou não com alendronato em dias alternados. Os animais foram divididos em quatro grupos: controle, alendronato, ovariectomia e ovariectomia + alendronato. Após quatro semanas do início do tratamento sistêmico com alendronato, a cirurgia foi realizada para instalação dos implantes. Nos grupos que receberam o BF a droga foi mantida por mais quatro semanas até o sacrifício dos animais. Os grupos que receberam alendronato apresentaram resultados histométricos e de densidade óssea radiográfica superiores aos demais,

enquanto os piores resultados foram verificados para o grupo com deficiência estrogênica.

Gao et al.⁸⁹ (2009) examinaram em ratas Sprague-Dawley ovariectomizadas as alterações na osseointegração de implantes que haviam sido imersos por 24 horas em soluções com ácido zoledrônico e/ou fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF). Quatro grupos compreenderam este estudo e cada um representou a solução na qual os implantes foram imersos: água destilada (grupo controle), ácido zoledrônico 1mg/ml, bFGF 20µg/ml e ácido zoledrônico 1mg/ml + bFGF 20µg/ml. O grupo controle apresentou resultados significativamente piores para parâmetros histomorfométricos, mecânicos e de microtomografia computadorizada do osso formado ao redor do implante, quando comparado aos demais grupos.

Carvas et al.³⁶ (2010) avaliaram o efeito do ácido zoledrônico, em dose única, sobre a osseointegração de implantes instalados em tíbias de coelhos com perda óssea induzida pelo uso de corticóides durante 18 semanas. Os animais foram divididos em três grupos: controle, metilprednisolona (três vezes/semana) e metilprednisolona (três vezes/semana) + ácido zoledrônico (monodose no dia da cirurgia). Os animais que receberam dose única do ácido zoledrônico apresentaram melhores parâmetros de osseointegração quando comparados ao grupo metilprednisolona, com resultado similar ao grupo controle.

Yildiz et al.²¹² (2010) avaliaram a osseointegração de implantes em tíbias de coelhas ovariectomizadas, tratadas ou não com dose única de ácido zoledrônico. Os animais foram alocados em três diferentes grupos: cirurgia fictícia, ovariectomia e ovariectomia + ácido zoledrônico, sendo que a infusão endovenosa de ácido zoledrônico ou solução salina foi realizada no dia da cirurgia para instalação do implante. A administração sistêmica de ácido zoledrônico demonstrou resultados

significativamente superiores para as análises histométricas, de estabilidade dos implantes e densitométricas quando comparado ao grupo ovariectomia.

Dayer et al.⁵⁴ (2010) avaliaram implantes instalados em tíbias de ratas Sprague-Dawley submetidas a uma dieta pobre em proteína e tratadas com pamidronato, paratormônio, reposição proteica ou solução salina. O tratamento foi iniciado a partir da cirurgia para instalação dos implantes. Os grupos tratados com pamidronato e paratormônio apresentaram melhores resultados em comparação aos demais grupos na avaliação realizada por meio de microtomografia, na qual foi analisado o volume ósseo, contato osso/implante e espessura de trabéculas.

Lee et al.¹²⁸ (2011) avaliaram os benefícios da adição do ibandronato à superfície de implantes. Três grupos foram avaliados de acordo com o tipo de superfície: usinada, anodizada + tratada termicamente, e anodizada + tratada termicamente + ibandronato, em tíbias de ratos Wistar. A osseointegração foi avaliada por meio do teste de torque reverso e microtomografia. Os implantes tratados com BF apresentaram melhores resultados quanto ao torque reverso e área mais densa ao redor do implante quando comparado aos outros grupos.

Huja et al.¹¹² (2011) examinaram a osseointegração de mini-implantes, instalados na maxila e mandíbula de cães tratados ou não com ácido zoledrônico, por 16 semanas. Os resultados demonstraram que os animais tratados com BF apresentaram menor taxa de formação óssea. Entretanto, foi constatado que houve remodelação óssea na área ao redor dos implantes, sugerindo que a cicatrização pode ocorrer mesmo em animais em uso de BF mais potente.

Giro et al.⁹¹ (2011) avaliaram a influência da deficiência de estrógeno e seu tratamento com alendronato ou estrógeno no tecido ósseo ao redor de implantes previamente instalados. Os implantes foram

inicialmente instalados na tíbia de ratas Wistar e, após 60 dias, os animais foram divididos em 5 grupos: controle, cirurgia fictícia, ovariectomia, ovariectomia + estrógeno (20 µg/kg/dia) e ovariectomia + alendronato (50 µg/kg/dias alternados). O tecido ósseo ao redor dos implantes foi analisado por meio de histometria e a taxa de aposição mineral pela marcação com fluorocromo. Para análise do processo de remodelação óssea foram quantificados os marcadores osteocalcina (formação) e DPD (reabsorção), respectivamente no soro e urina. Os animais ovariectomizados apresentaram aumento nos marcadores de remodelação óssea e demonstraram resultados significativamente inferiores quanto aos parâmetros histométricos e de taxa de aposição mineral em comparação a todos os outros grupos. O grupo que recebeu alendronato apresentou menores valores dos marcadores de remodelação óssea, assim como da taxa de aposição mineral em comparação ao grupo que foi submetido à cirurgia fictícia. Neste estudo os tratamentos instituídos foram efetivos ao prevenir a perda de massa óssea sistêmica e ao redor do implante relacionada à deficiência estrogênica.

⇒ **Estudos em humanos**

Jeffcoat¹¹⁶ (2006) avaliando os resultados de dois estudos prospectivos, controlados e cegos, quanto à segurança do tratamento com implantes dentários em pacientes que utilizaram BF orais, constatou que o uso do medicamento não foi considerado um fator de risco à instalação de implantes dentais. Entretanto, afirma que a decisão quanto à realização de procedimentos cirúrgicos deve considerar os possíveis riscos de complicação e a relação custo/benefício.

Fugazzotto et al.⁸⁷ (2007) realizaram uma análise retrospectiva de pacientes com histórico de uso de BF orais, tratados com implantes dentários e acompanhados por um período de 12 a 24 meses.

Nenhum caso de lesão osteonecrótica foi verificado e todos os implantes estavam em adequada função após sua instalação. Neste estudo, o histórico de uso de BF orais por um período em média de 3 anos e 4 meses não foi um fator que contribuiu para a ocorrência de complicações. Entretanto, os autores relatam a necessidade de estudos maiores e controlados para que se possa afirmar com segurança que pacientes que utilizam ou utilizaram BF orais podem ser submetidos à instalação de implantes dentários.

Grant et al.⁹⁷ (2008) avaliaram retrospectivamente pacientes que faziam uso de BF e que receberam implantes dentários no período entre 1998 e 2006. A maioria dos implantes instalados apresentou osseointegração sem intercorrências, com taxa de sucesso similar a pacientes que não recebiam o medicamento.

Bell, Bell¹⁵ (2008) realizaram um estudo retrospectivo para avaliar se pacientes em uso de BF possuíam maior risco de complicações pós-cirurgia para instalação de implantes dentários. Um total de 101 implantes foram instalados em 42 pacientes com histórico de uso de BF por um período que variou entre seis meses a onze anos. Os pacientes foram clinicamente avaliados quanto à perda de implantes, alterações periodontais, altura da crista óssea e sinais de osteonecrose dos maxilares. Os resultados demonstraram que o uso da medicação não resultou em maiores efeitos adversos, sendo a taxa de sucesso dos implantes similar à relatada na literatura.

Kasai et al.¹¹⁸ (2009) avaliaram, de maneira retrospectiva, mulheres que faziam uso de BF e que receberam implantes dentários, comparando-as a um grupo controle. A análise foi realizada por meio de fichas clínicas e radiografias de pacientes atendidas em uma universidade durante o período de 1994-2006. A taxa de sucesso relatada para as pacientes que faziam uso do BF foi de 86%, enquanto que para as do grupo controle foi de 95%.

Madrid, Sanz¹³⁷ (2009) realizaram uma revisão sistemática para avaliar se pacientes em uso de BF orais e endovenosos poderiam ser submetidos a cirurgias para instalação de implantes. Apesar da maioria dos estudos incluídos apresentar baixo poder de evidência científica, falhas na metodologia e possuir curto intervalo de acompanhamento, foi constatado que o uso de BF orais não alterou a taxa de sucesso dos implantes dentários. Não foram relatados casos de osteonecrose nos maxilares e a instalação de implantes não foi contraindicada.

Embora estudos em animais e humanos não tenham demonstrado resultados negativos do uso de BF sobre a osseointegração de implantes instalados em regiões distintas da cavidade oral, novos estudos controlados com maior nível de evidência científica são necessários para poder afirmar com total segurança que pacientes em uso de BF podem ser submetidos à terapia com implantes dentários. De acordo com alguns autores pacientes em uso de BF orais por menos de três anos apresentam menor risco para ocorrência de complicações, podendo receber implantes dentários com certas precauções (Ruggiero et al.¹⁷⁶, 2009; Khosla et al.¹²¹, 2008; Khan et al.¹²⁰, 2008; AAOMS¹, 2007). Já pacientes em tratamento concomitante com corticóides ou quimioterápicos ou que usam BF orais por mais de três anos, a interrupção do tratamento pode ser considerada necessária para realização de um procedimento cirúrgico. Tal medida deve ser considerada uma vez que a utilização progressiva dos BF promove uma queda nos níveis dos marcadores de remodelação óssea, aumentando o risco de intercorrências (Grey et al.¹⁰⁰, 2009; Grey et al.⁹⁹, 2010). A interrupção da droga por um período de 4-6 meses é relatada na literatura como “drug holiday” e é considerada segura e sensata, uma vez que o intervalo no tratamento promove um aumento na função dos osteoclastos e dos níveis dos marcadores de reabsorção e formação óssea (Fraser et al.⁸⁰, 2011; Marx et al.¹⁴¹, 2007).

Entretanto, diversos autores contestam essas afirmações por não possuírem fundamentos científicos suficientes e sugerem que novos estudos sejam realizados a fim de que seja definida a aplicação clínica dos testes bioquímicos na avaliação da normalização da remodelação e do reparo ósseo (Baim, Miller¹², 2009; Khosla et al.¹²¹, 2008; Schwartz¹⁸⁷, 2008; Novince et al.¹⁵⁴, 2009; Pazianas, Abrahansen¹⁶³, 2011).

Apesar dos estudos citados, ainda não está claro qual o tempo necessário de interrupção da droga para que haja normalização da remodelação óssea e para que o processo de reparo ósseo possa ocorrer sem complicações. Também não está comprovado se o restabelecimento dos níveis dos marcadores bioquímicos está correlacionado à normalização do processo de remodelação óssea.

PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar, em ratas, o efeito da interrupção do tratamento com alendronato sobre o tecido ósseo ao redor de implantes osseointegráveis e sobre os marcadores de remodelação óssea.

MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS

Foram utilizadas para este estudo 70 ratas Wistar, com idade aproximada de 30 dias e peso variando entre 80 e 110g. Os animais foram alimentados com ração sólida padrão para animais de laboratório e água *ad libitum*. A temperatura foi controlada a 25°C e a umidade em 55%, sendo o tempo de exposição ao claro de 12 horas e 30 minutos e, ao escuro, de 11 horas e 30 minutos.

Esta pesquisa foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (Proc. CEEA nº 12/2009).

DELINEAMENTO DO ESTUDO

Após um período de dois dias para instalação e adequação ao ambiente do biotério, os animais foram divididos de forma aleatória em 2 grupos: grupo controle (n=10) e grupo teste (n=60). Os animais do grupo controle (CTLE) receberam injeção subcutânea de solução salina estéril uma vez por semana, enquanto os animais do grupo teste (ALE) receberam a administração de alendronato, por via subcutânea, na concentração de 1mg/kg, uma vez por semana.

Decorrido o período de 120 dias o tratamento com alendronato foi suspenso para 50 animais, enquanto que para 10 animais a droga foi administrada durante todo o período experimental (grupo ininterrupto - INT). Os animais do grupo ALE receberam um implante de titânio na metáfise tibial esquerda nos dias 0, 7, 14, 28 e 45 após a suspensão do tratamento e foram sacrificados 28 dias após a instalação dos implantes. Nos animais dos grupos CTLE e INT, o implante foi inserido no dia 120 e os animais foram sacrificados após 28 dias da instalação do implante. O desenho do estudo é apresentado na figura 2, para os grupos CTLE, INT e 0 dias, e na figura 3 para os demais grupos que tiveram a medicação suspensa no dia 120.

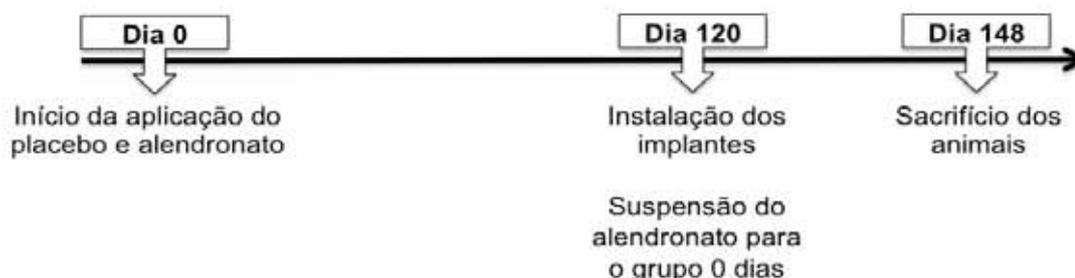


FIGURA 2 – Desenho experimental do estudo para os grupos CTLE, INT (sem interrupção do tratamento com alendronato) e 0 dias (colocação do implante no dia da suspensão da medicação).



FIGURA 3 – Desenho experimental do estudo para os grupos que receberam os implantes 7, 14, 28 e 45 dias após a suspensão do tratamento com alendronato.

Os animais foram sacrificados por meio do aprofundamento da anestesia, sendo removida a tíbia contendo o implante, a coluna lombar e o fêmur esquerdo de cada animal. Os espécimes foram fixados por 48 horas em paraformaldeído 4% tamponado (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil) e após lavagem com água corrente por 24 horas, armazenados em álcool 70%.

Nos dias da instalação dos implantes e sacrifício dos animais foram coletadas amostras de sangue para avaliação de marcadores de formação e reabsorção óssea.

CIRURGIA PARA INSTALAÇÃO DOS IMPLANTES

Os animais foram anestesiados com uma combinação de cloridrato de ketamina 10% (Cetamin®; Syntec Ltda, Cotia, SP, Brasil) na concentração de 0,08ml/100g e cloridrato de xilazina 2%, na concentração de 0,04ml/100g (Xilazin®; Syntec Ltda, Cotia, SP, Brasil). Após anestesia, estes foram submetidos à tricotomia da região interna da perna esquerda e realizada a antissepsia com gaze estéril embebida em solução de iodopovidona. Uma incisão de aproximadamente 10 mm foi realizada na metáfise tibial esquerda (Figura 4).

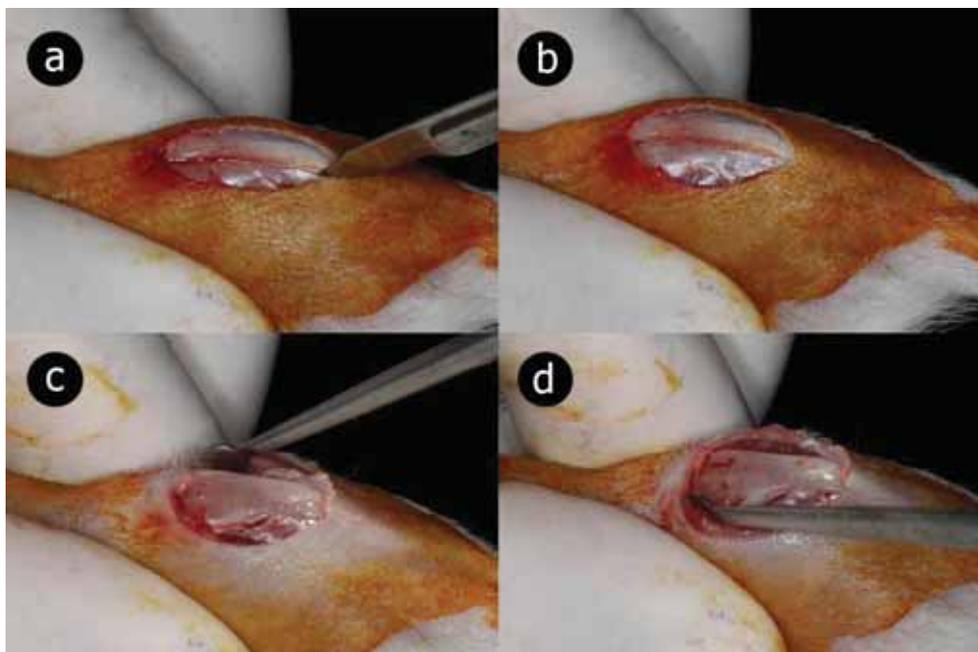


FIGURA 4 – Incisão (a,b) e descolamento do tecido para exposição da região de instalação do implante (c,d).

Após dissecação delicada, o tecido ósseo foi submetido a osteotomia (Figura 5), realizada por meio de uma sequência progressiva de fresas (fresa lança e fresa helicoidal de 1,8 mm) para acomodar um implante de titânio de 4 mm de comprimento por 2,2 mm de diâmetro (Conexão Sistema de Prótese, Arujá, SP, Brasil), com superfície porosa tratada por ácido (superfície Porous[®]). Todas as perfurações foram realizadas com um motor elétrico (BLM 600[®]; Driller Equipamentos Elétricos Ltda, São Paulo, SP, Brasil) ajustado a 1200 RPM, sob abundante irrigação com solução salina estéril.

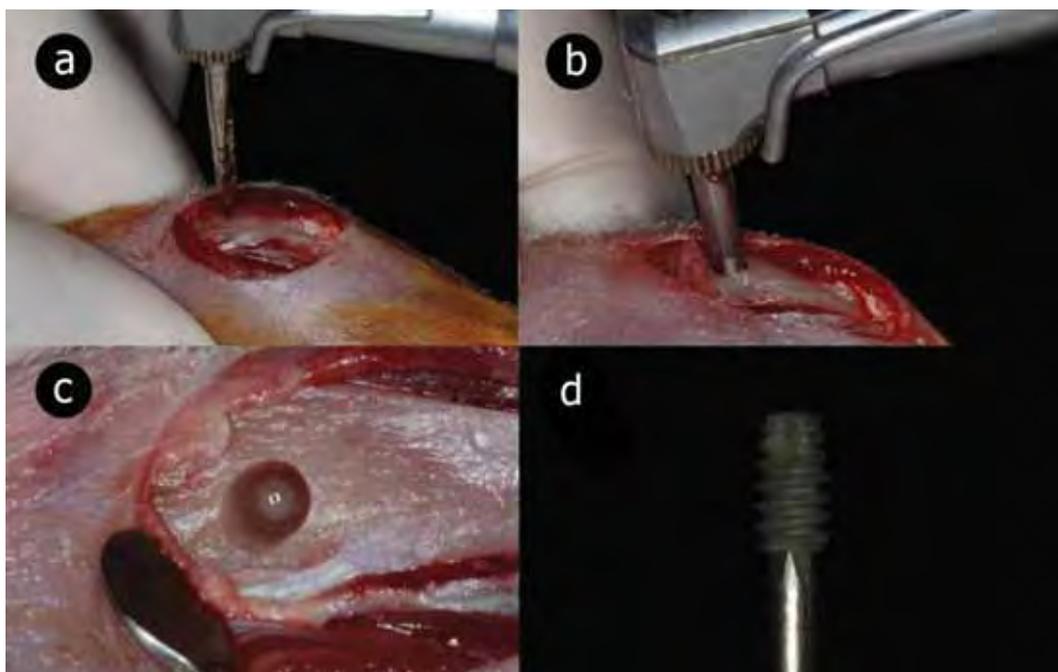


FIGURA 5 – Perfuração com fresa lança (a) e espiral 1,8 mm (b) sob constante irrigação para criar o leito ósseo (c) para inserção do implante (d).

O implante foi instalado com a ajuda de uma chave digital hexagonal (Conexão Sistema de Prótese, Arujá, SP, Brasil) como mostrado nas figuras 5a e 5b.

A área operada foi suturada em planos, internamente com fio reabsorvível 5.0 (Vicryl® Ethicon; Johnson & Johnson Produtos Profissionais Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil) e externamente com fio de seda 4.0 (Ethicon; Johnson & Johnson Produtos Profissionais Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil) (Figura 6).

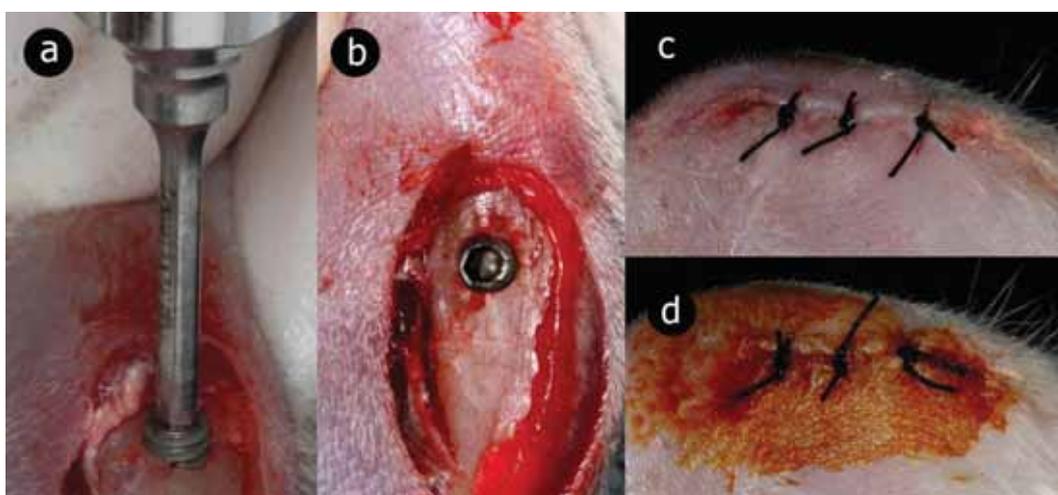


FIGURA 6 – Instalação do implante com chave digital (a,b), sutura (c) e antissepsia da área operada (d) .

Os animais receberam, uma dose única de penicilina associada à estreptomicina na dosagem 0,1 ml/kg de peso (Multibiótico Veterinário®; Vital Farma Ltda, São Sebastião do Paraíso, MG, Brasil), 5mg/kg de corticóide intramuscular (Cort-Trat®; Química Santa Marina S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e 20mg/kg de dipirona sódica (Dipirona Ibase®; Laboratório Ibase Ltda, Porto Alegre, RS, Brasil) por 3 dias consecutivos.

ANÁLISE DA DENSIDADE ÓSSEA

A análise da densidade mineral óssea (BMD) foi realizada no fêmur e vértebras lombares para a constatação do efeito sistêmico do medicamento. Para isso foi utilizado um densitômetro (QDR 2000; Hologic Inc, Bedford, MA, EUA), sendo a análise da densitometria óssea realizada por *Dual-energy X-ray Absorptiometry* (DXA), empregando-se o software para pequenos animais fornecido pelo fabricante do densitômetro, no modo de alta resolução. A técnica foi padronizada para todos os grupos, tanto para o fêmur como para as vértebras lombares.

Para calibração do aparelho foi utilizado um bloco padrão (*phantom*) composto por três camadas sintéticas, de constituição semelhante ao osso, com área e conteúdo mineral conhecido.

A delimitação das regiões analisadas foi realizada por ferramentas existentes no programa do aparelho, selecionando sempre o mesmo espaço a fim de padronizar as medidas de todas as sub-regiões.

Foram efetuadas medidas de BMD global e de sub-regiões, assim determinadas:

⇒ Fêmur: R1) epífise proximal; R2) epífise distal e R3) diáfise (figura 7)

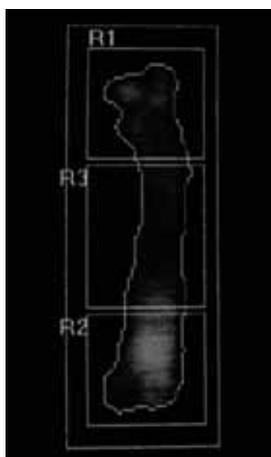


FIGURA 7 – Imagem obtida pelo densitômetro e delimitação das sub-regiões para densitometria do fêmur.

⇒ Vértebras lombares: R1) L1. R2) L2. R3) L3. R4) L4 (Figura 8).

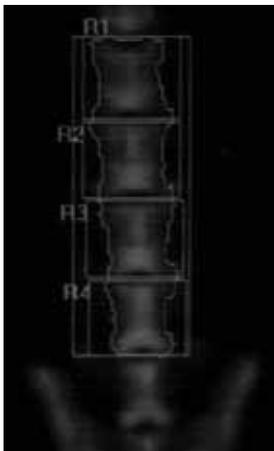


FIGURA 8 – Imagem obtida pelo densitômetro da área de vertebras lombares e delimitação das sub-regiões de interesse.

A precisão da DXA na determinação da BMD foi avaliada pela mensuração do coeficiente de variação, expresso como uma porcentagem da média (Grier et al.¹⁰¹, 1996; Gala Paniagua et al.⁸⁸, 1998). Para isso, cinco medidas consecutivas de cada região anatômica de uma mesma amostra foram realizadas.

AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MARCADORES DE FORMAÇÃO E REABSORÇÃO ÓSSEA.

No momento da instalação dos implantes e do sacrifício dos animais foram realizadas coletas de 1,5ml de sangue, por meio de punção da artéria caudal para a realização dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA).

As amostras de sangue total foram centrifugadas (1800 RPM durante 15min a 4°C) para separação do soro. A avaliação da concentração de osteocalcina (OCN; RatMID Osteocalcin®; Immunodiagnostic Systems Inc, Boldon. Reino Unido), propeptídeo amino-terminal do pro-colágeno tipo 1 (P1NP; Rat Mouse P1NP®; Immunodiagnostic Systems Inc, Boldon. Reino Unido) e telopeptídeo C-

terminal do colágeno tipo 1 (CTX; RatLaps®; Immunodiagnostic Systems Inc, Boldon. Reino Unido) foi realizada por meio de testes ELISA, com utilização de kits comerciais, seguindo as orientações do fabricante.

ANÁLISE HISTOMÉTRICA

Após o processo de fixação e posterior lavagem com água corrente, o espécime relativo à tibia contendo o implante, foi desidratado em soluções crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90%, 96%, e dois banhos em etanol 100%) sob constante agitação.

A infiltração plástica foi realizada com misturas de glicolmetacrilato (Technovit 7200 VLC, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany) e álcool etílico, seguindo variações gradativas na proporção álcool/glicolmetacrilato (70/30, 50/50, 30/70), finalizando com duas infiltrações de glicolmetacrilato puro, sob agitação constante. Após a infiltração plástica os espécimes foram incluídos em resina e polimerizados.

O bloco foi removido do molde e montado em uma lâmina acrílica com auxílio de uma resina (Technovit 4000, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany). Por meio da utilização de um sistema de corte (EXAKT Apparatebau GmbH & Co., Norderstedt, Schleswig-Holstein, Germany) (Donath, Breuner⁵⁹, 1982), foi realizado o corte preliminar visando o centro do implante. O corte obtido foi polido e colado em uma lâmina com uma resina adesiva de precisão (Technovit 7210 VLC, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany). Um novo corte foi realizado, obtendo-se uma secção de aproximadamente 100µm, que em seguida foi submetida a um sistema de microdesgaste e polimento, resultando em uma secção de 30 a 50 µm de espessura.

As lâminas foram coradas com azul de toluidina a 1% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e os parâmetros histométricos

analisados foram: extensão linear de tecido ósseo em contato direto com a superfície do implante (BIC) e fração da área entre as roscas do implante ocupada por tecido ósseo (BAFO).

As mensurações foram realizadas por um operador treinado e cego, utilizando um microscópio óptico (LEICA DM 2500 - Leica Microscopy and Scientific Instruments Group, Wetzlar, Germany), em aumento de 100 vezes. As imagens foram selecionadas e enviadas para um microcomputador (Intel Core 2 duo, 2.33 GHz, 2 Gb RAM) por meio de uma câmera de vídeo (LEICA DFC-295 - Leica Microsystems Ltda, Wetzlar, Germany), acoplada ao microscópio óptico.

A determinação dos valores foi feita empregando-se um software analisador de imagens (ImageJ 1.34 - National Institutes of Health, Bethesda). Os valores para a extensão linear de tecido ósseo em contato direto com a superfície do implante e para a área entre as roscas ocupadas por tecido ósseo foram obtidos.

Foi realizada também a análise descritiva da morfologia do tecido ósseo presente ao redor dos implantes.

ANÁLISE DOS DADOS

A avaliação da normalidade dos dados foi realizada por meio do uso do teste D'Agostino-Pearson. Para análise de dados paramétricos (densitometria óssea do fêmur e das vértebras lombares, CTX, BIC) foram utilizados os testes ANOVA e Tukey. Os dados não paramétricos (OCN, P1NP, BAFO) foram analisados pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn. O nível de significância foi estabelecido em 5% e a hipótese de nulidade foi rejeitada se $p < 0,05$.

RESULTADOS

PARÂMETROS CLÍNICOS

A utilização do alendronato não promoveu nenhuma intercorrência durante o período experimental. A droga não influenciou o peso dos animais, já que não houve diferença de peso entre os animais ao final do tratamento, e os implantes instalados na tíbia não apresentaram nenhum tipo de complicação pós cirúrgica.

ANÁLISE DENSITOMÉTRICA

A análise dos dados referentes à densitometria óssea global do fêmur e das sub-regiões R1 (epífise proximal), R2 (epífise distal) e R3 (diáfise) demonstrou o aumento estatisticamente significativo da densidade mineral óssea para os grupos que receberam o alendronato quando comparados ao grupo CTLE. A análise da sub-região R2 demonstrou o aumento estatisticamente significativo da densidade mineral óssea do grupo 45 dias quando comparado ao grupo 0 dias (figura 9).

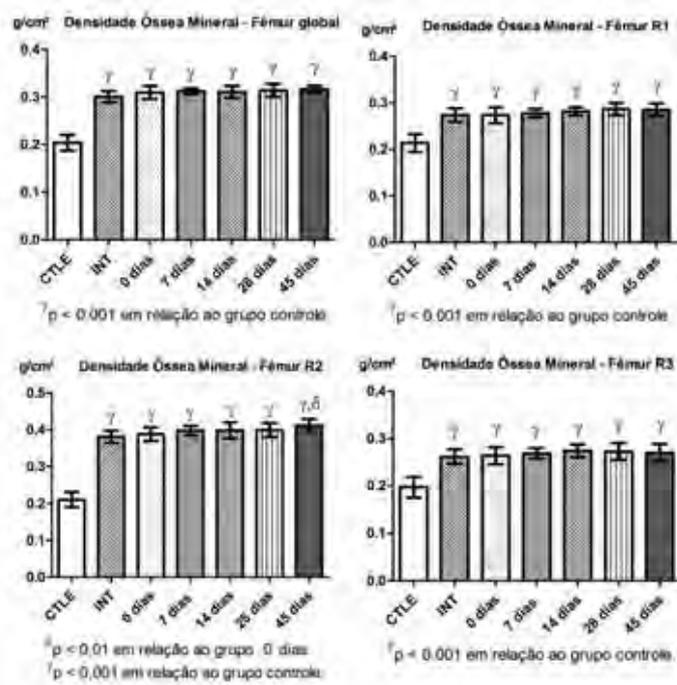


FIGURA 9 – Análise densitométrica global do fêmur e sub-regiões.

Quanto à densitometria óssea das vértebras lombares, a análise dos dados demonstrou que houve um aumento estatisticamente significativo em todas as regiões avaliadas para os grupos que receberam alendronato em comparação ao grupo CTLE. O grupo 14 dias apresentou um aumento significativo de densidade com relação ao grupo 0 dias na avaliação da vértebra L4. Da mesma forma, o grupo 45 dias apresentou valores significativamente maiores na avaliação global e vértebras L3 e L4 quando comparado ao grupo 0 dias (Figura 10).

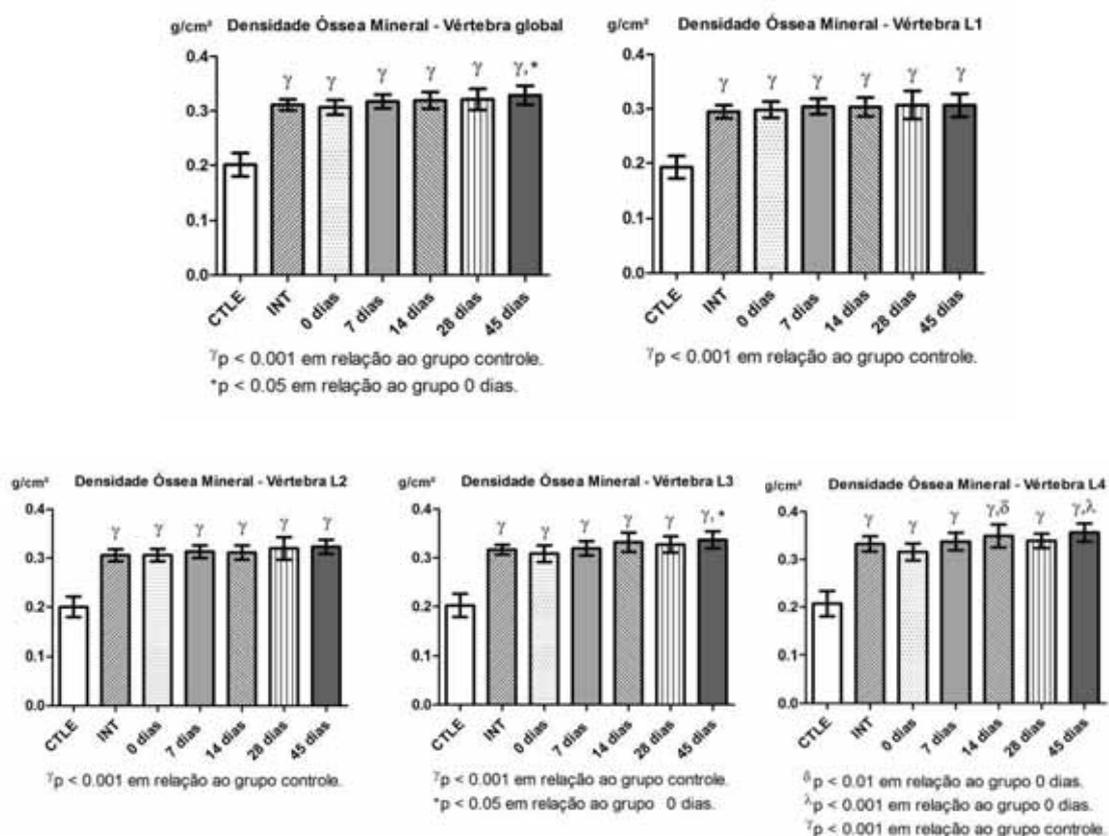


Figura 10 – Análise densitométrica das vértebras lombares.

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE MARCADORES DE FORMAÇÃO E REABSORÇÃO ÓSSEA.

⇒ **Amostras coletadas no dia da cirurgia para instalação dos implantes**

Apesar da concentração sérica de CTX nos grupos submetidos ao tratamento com alendronato apresentarem valores menores em relação ao grupo CTLE, não foi observada diferença estatisticamente significativa. O grupo 28 dias apresentou aumento estatisticamente significativo da concentração de CTX quando comparado aos grupos INT e 0 dias (figura 11).

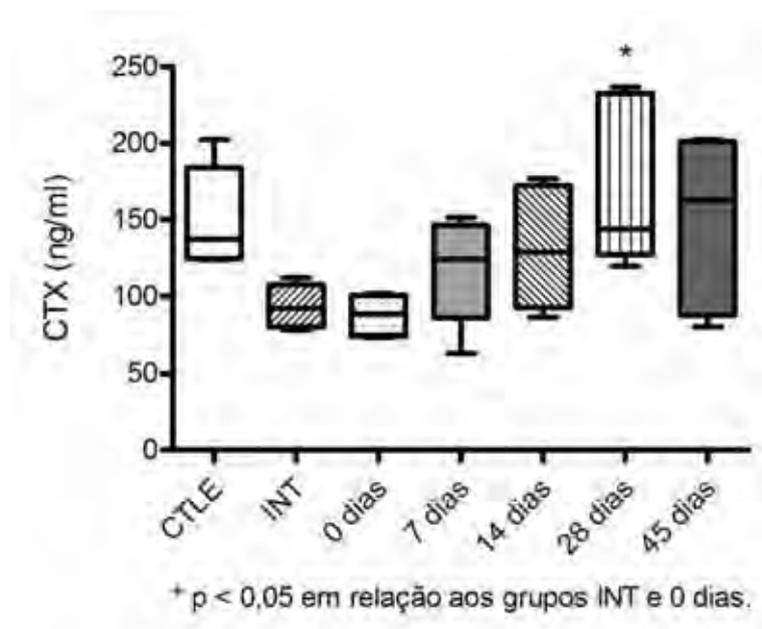


FIGURA 11 – Representação gráfica dos níveis séricos de CTX de amostras obtidas no dia da cirurgia para instalação dos implantes.

A análise dos marcadores de formação óssea demonstrou, de modo geral, uma redução nos animais tratados com alendronato em

relação ao grupo CTLE. Porém os resultados só foram estatisticamente significantes para o grupo 7 dias, com relação à osteocalcina (figura 12) e para os grupos 7 dias e 45 dias com relação à concentração do P1NP (figura 13).

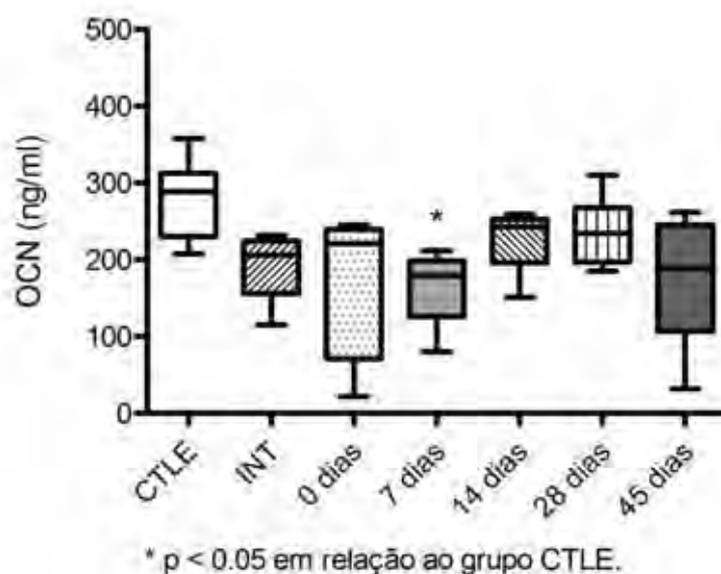


FIGURA 12 – Representação gráfica dos níveis séricos de OCN de amostras obtidas no dia da cirurgia para instalação dos implantes.

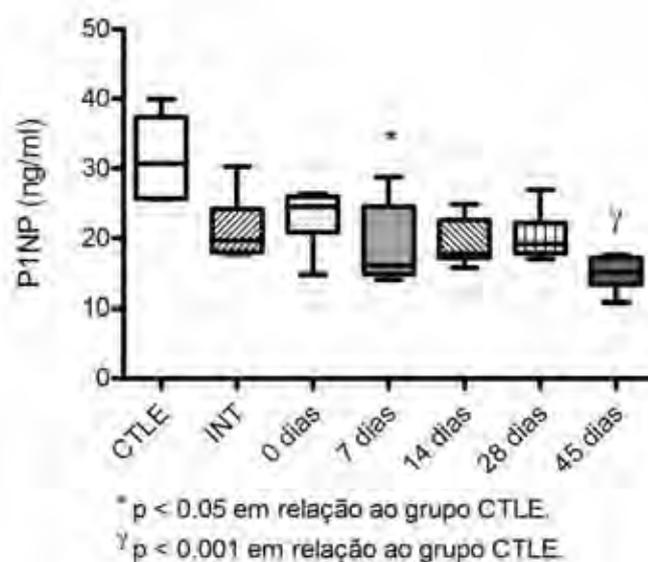


FIGURA 13 – Representação gráfica dos níveis séricos de P1NP de amostras obtidas no dia da cirurgia para instalação dos implantes.

⇒ **Análise das amostras de sangue coletados no dia do sacrifício dos animais**

Na análise das amostras de soro coletadas no dia do sacrifício, os animais dos grupos INT e 45 dias apresentaram concentrações significativamente menores de CTX quando comparados aos grupos CTLE, 7 e 14 dias (figura 14).

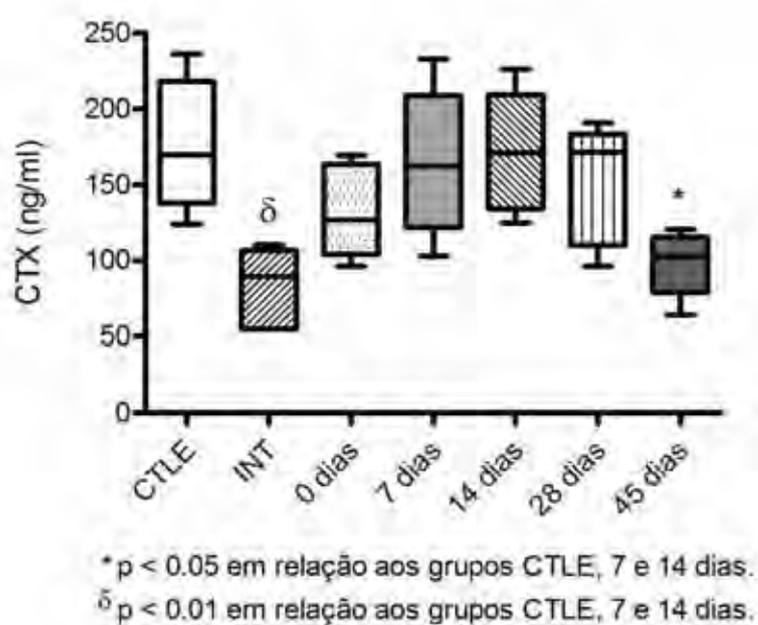


FIGURA 14 – Representação gráfica dos níveis séricos de CTX de amostras obtidas no sacrifício dos animais.

De maneira similar a avaliação da OCN apresentou menor concentração em todos os grupos em relação ao CTLE, apesar da diferença ser estatisticamente significativa apenas nos grupos INT e 45 dias (figura 15).

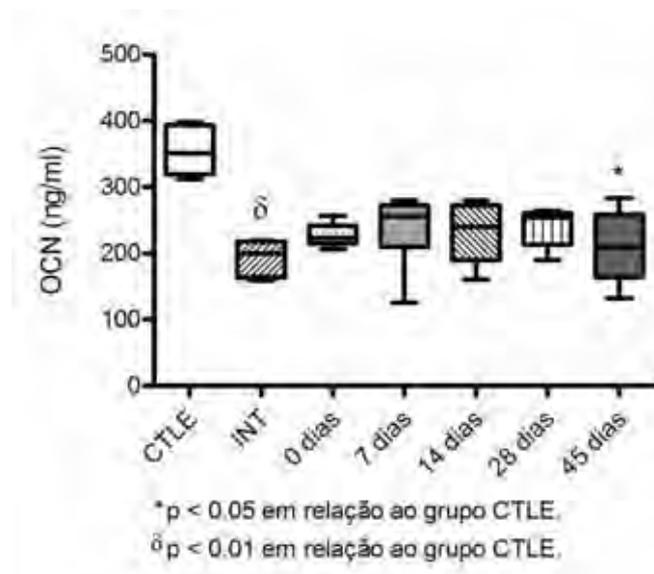


FIGURA 15 – Representação gráfica dos níveis séricos de OCN de amostras obtidas no sacrifício dos animais.

A concentração de P1NP apresentou concentrações significativamente menores nos grupos 14, 28 e 45 dias quando comparados aos grupos CTLE e 7 dias (figura 16).

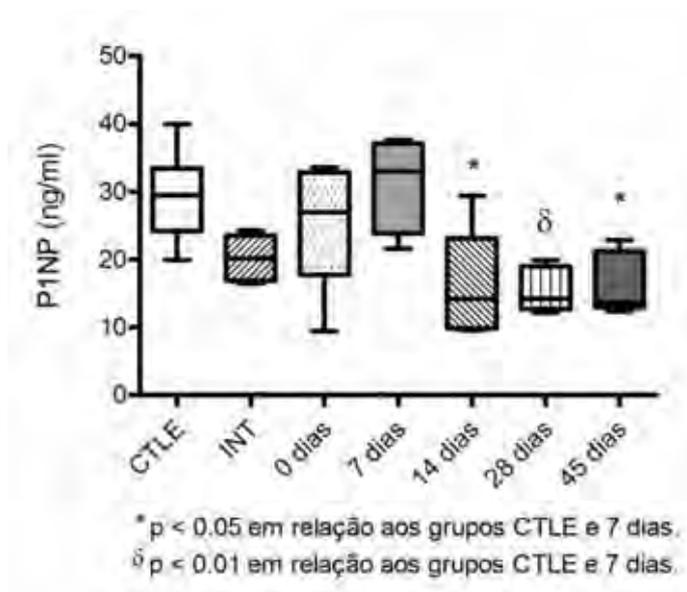


FIGURA 16 – Representação gráfica dos níveis séricos de P1NP de amostras obtidas no sacrifício dos animais.

ANÁLISE HISTOMÉTRICA

A avaliação da quantidade de tecido ósseo em contato com a superfície do implante (BIC) demonstrou que os grupos que receberam o tratamento com alendronato apresentaram menores valores quando comparados ao grupo CTLE, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos do estudo (figura 17).

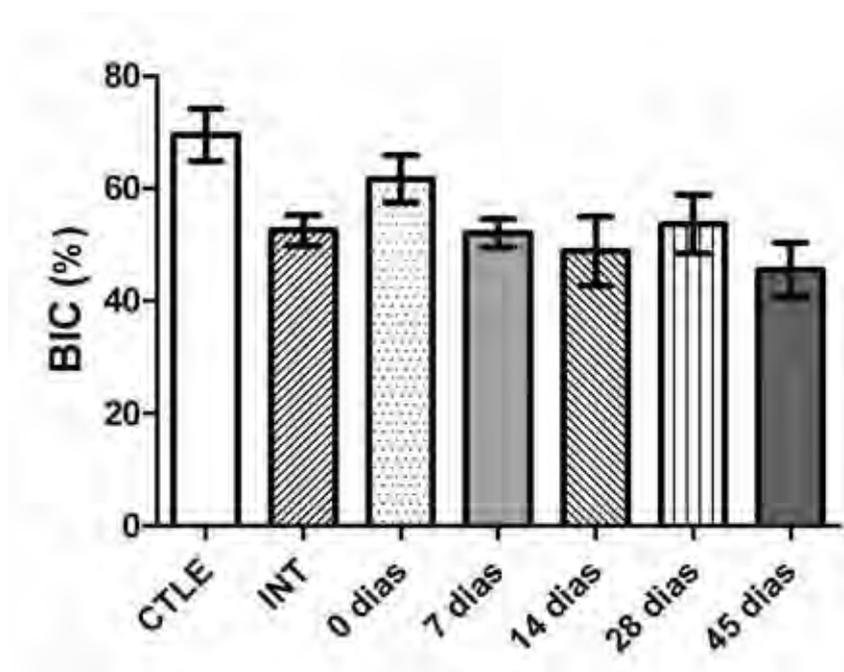


FIGURA 17 – Representação gráfica do percentual da extensão linear de tecido ósseo em contato direto com a superfície do implante (BIC).

Por outro lado, os grupos tratados com alendronato apresentaram um maior percentual de osso formado entre as rosca do implante (BAFO) em relação ao grupo CTLE, porém sem diferença estatisticamente significativa, com exceção do grupo 45 dias que apresentou os menores valores de preenchimento de rosca por tecido ósseo, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 0 dias, assim como apresentado na figura 18.

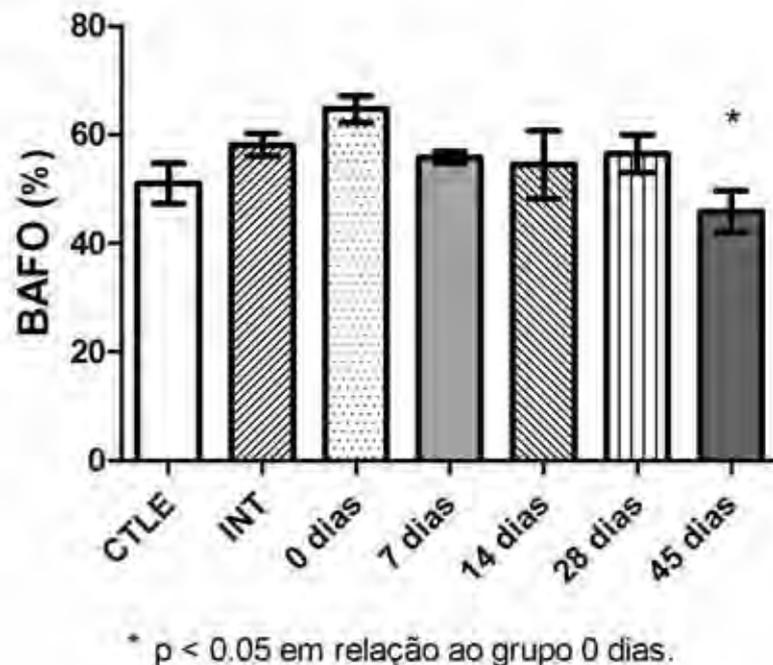


FIGURA 18 – Representação gráfica do percentual da área entre as roscas ocupadas por tecido ósseo (BAFO).

ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA

Na análise histológica (figura 19-26) foi possível verificar uma diferença marcante entre os grupos que receberam alendronato e o grupo CTLE.

Nos animais que não receberam tratamento com alendronato, o tecido se apresentava saudável, compacto, apresentando lamelas paralelas envolvendo as roscas dos implantes, bem como conjuntos lamelares concêntricos, formando canais harvesianos, no osso recém aposicionado, como mostra a figura 19.

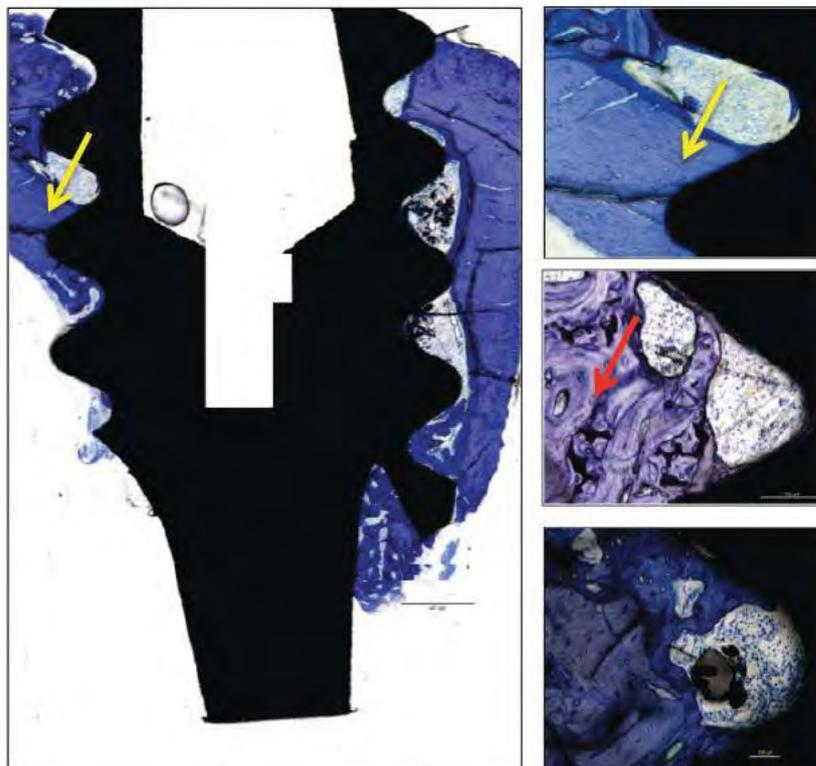


FIGURA 19 – Cortes histológicos representativos da morfologia óssea ao redor dos implantes inseridos nos animais pertencentes ao grupo CTLE. As setas vermelhas indicam a organização lamelar concêntrica dos osteons formados na área ao redor dos implantes. As setas amarelas mostram a organização das lamelas colágenas, paralelas entre si.

Por outro lado, nos grupos que tratados com alendronato, apesar de em alguns grupos apresentarem maior deposição de tecido ósseo, como mostrado na análise da fração de área da rosca do implante ocupada por tecido ósseo (BAFO), este apresentava-se com focos de deposição amorfas da matriz óssea, sem organização estrutural definida. De uma forma geral, não foi possível observar a presença de fibras colágenas organizadas em lamelas, características da formação óssea secundária e, a presença das lacunas onde estariam inserido os osteócitos no tecido depositado entre as roscas dos implantes.

Foi possível observar em alguns espécimes, o local da realização da osteotomia para a inserção do implante, sugerindo uma estagnação da remodelação óssea, mesmo nos animais que receberam os implantes 45 dias após a suspensão da medicação. Também pode-se observar a presença de uma fenda entre o tecido ósseo neoformado após osteotomia, e o tecido ósseo do leito receptor do implante.

Ilustramos abaixo (figura 20 a 26), os grupos tratados com alendronato e as características do tecido ósseo formado após a instalação dos implantes.

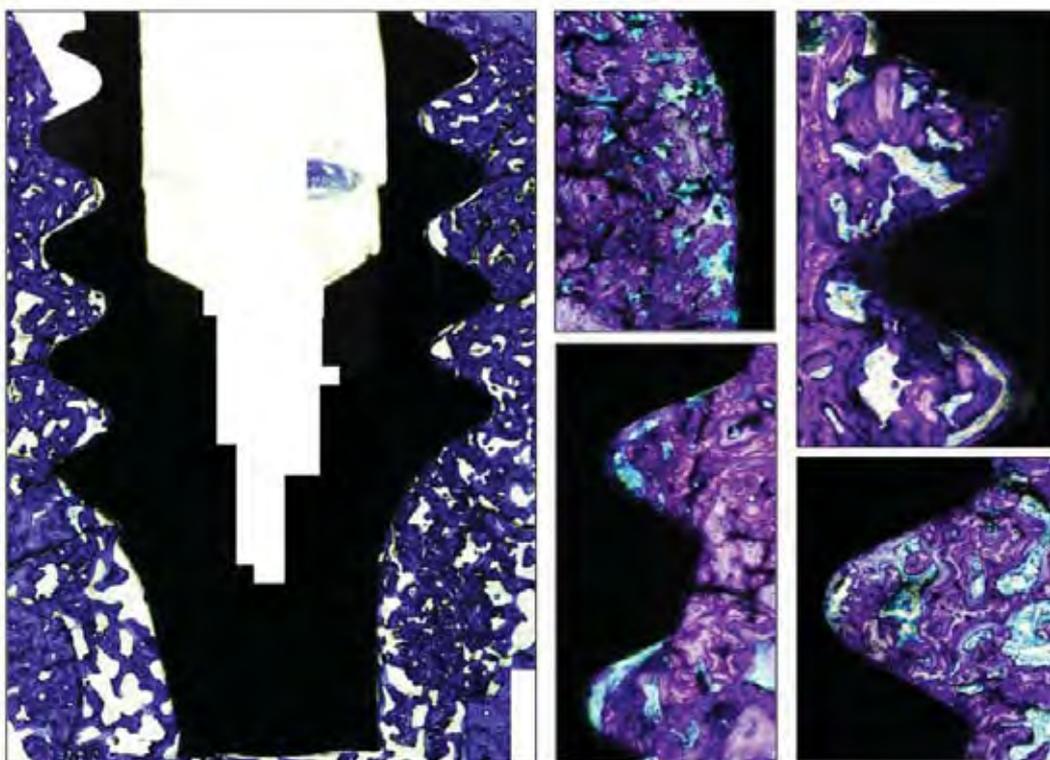


FIGURA 20 – Corte histológico representativo da morfologia óssea apresentada ao redor dos implantes inseridos nos animais pertencentes ao grupo INT (sem interrupção do tratamento com alendronato).

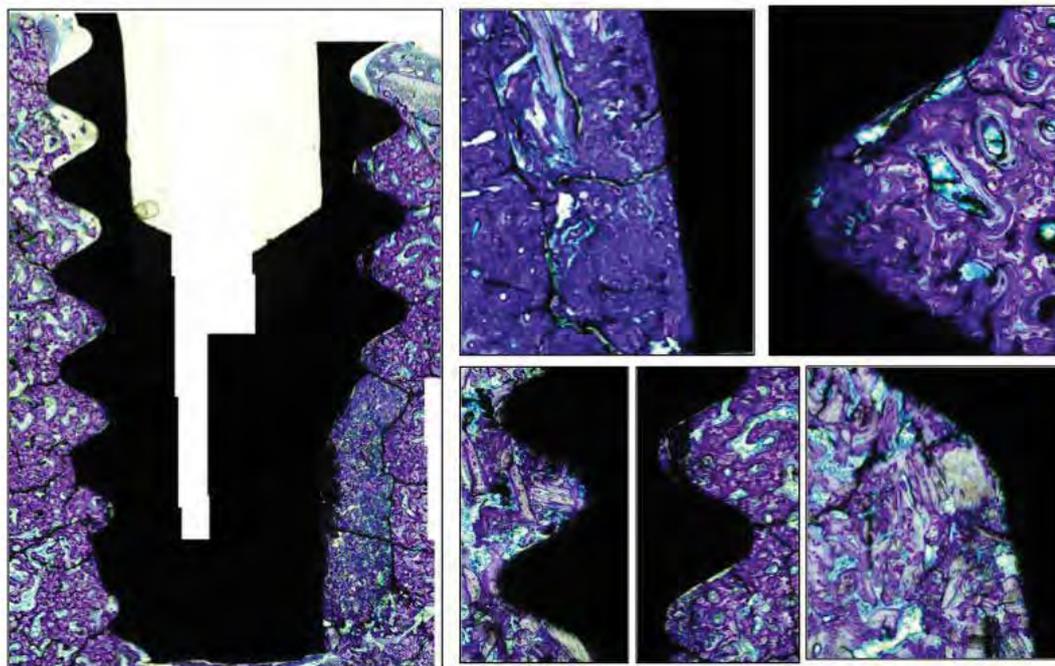


FIGURA 21 – Cortes histológicos representativos da morfologia óssea apresentada ao redor dos implantes inseridos nos animais pertencentes ao grupo 0 dias (tratamento com alendronato suspenso no dia da colocação dos implantes).

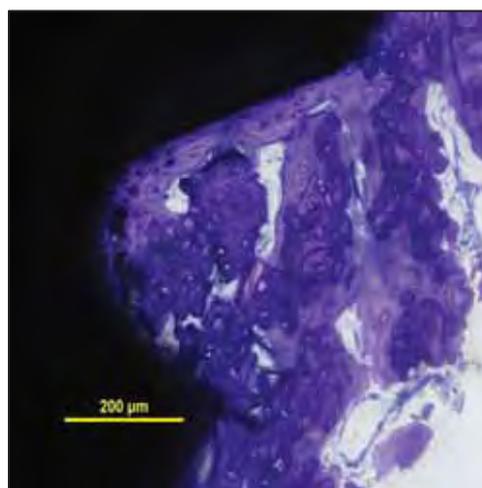


FIGURA 22 – Aumento de 200x de uma rosca preenchida com tecido ósseo, pertencente ao grupos 14 dias. Nota-se a presença de uma matriz

amorfa preenchendo-a, apesar da presença de um tecido ósseo mais organizado próximo à superfície do implante.

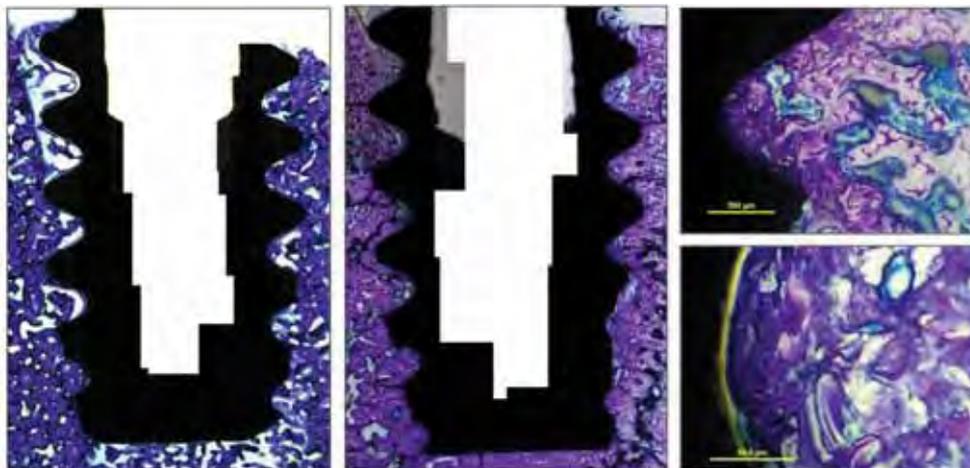


FIGURA 23 – Cortes histológicos representativos da morfologia óssea apresentada ao redor dos implantes inseridos nos animais pertencentes ao grupo 7 dias (implantes instalados 7 dias após a suspensão do tratamento com alendronato).

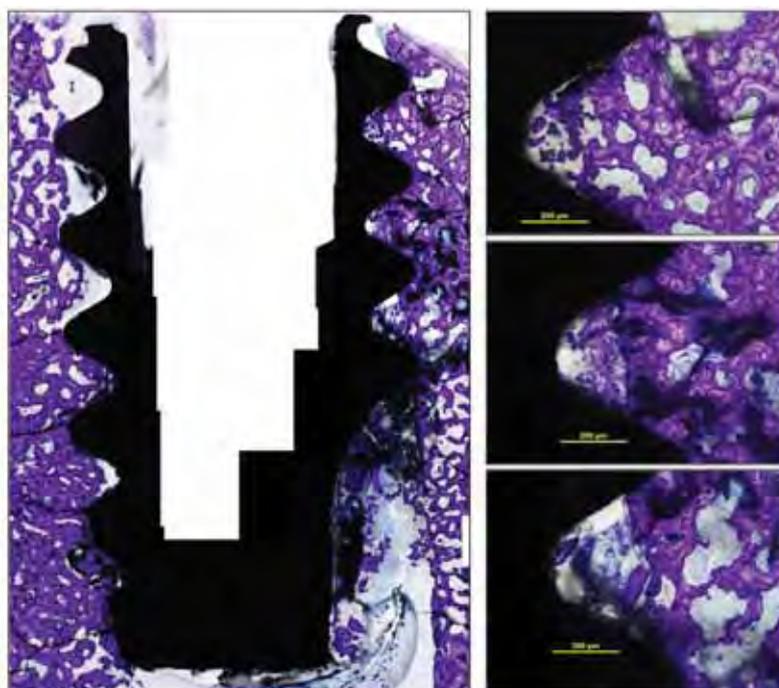


FIGURA 24 – Cortes histológicos representativos da morfologia óssea apresentada ao redor dos implantes inseridos nos animais pertencentes

ao grupo 14 dias (implantes instalados 14 dias após a suspensão do tratamento com alendronato).

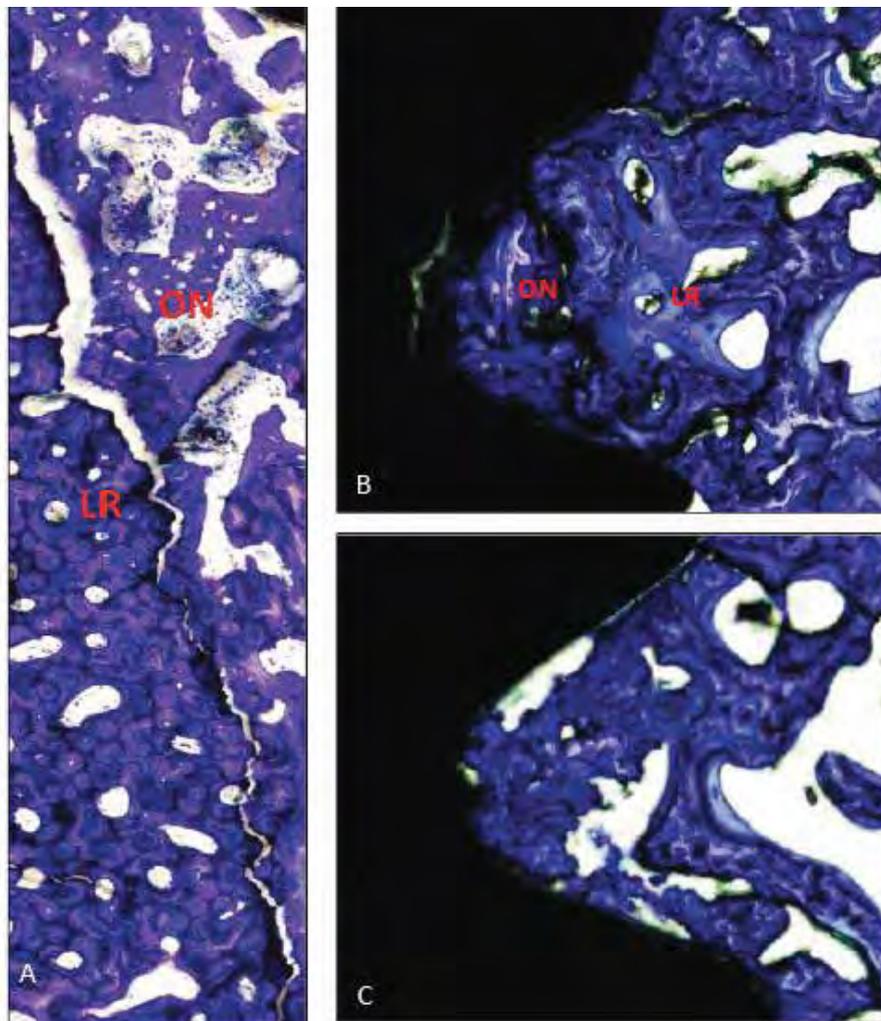


FIGURA 25 – Cortes histológicos representativos da morfologia óssea apresentada ao redor dos implantes inseridos nos animais pertencentes ao grupo 28 dias (implantes instalados 28 dias após a suspensão do tratamento com alendronato). Nas figuras 24a e 24b pode-se observar a presença de uma fenda separando o leito receptor (LR) e o osso neoformado (ON), sugerindo maior risco de perda do implante. A figura 24c ilustra a deposição de tecido ósseo ao redor do implante sem organização lamelar.

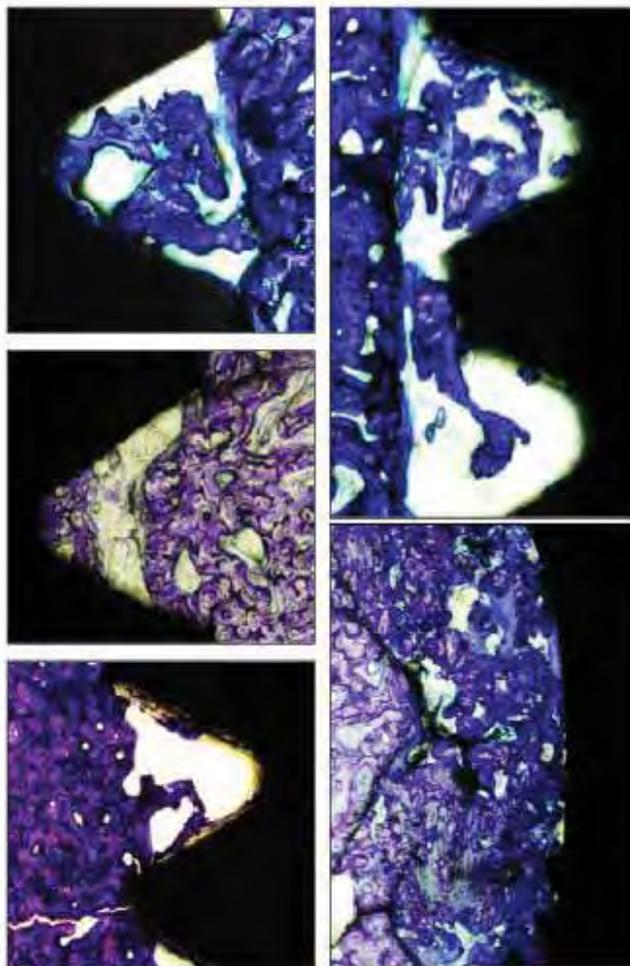


FIGURA 26 – Cortes histológicos representativos da morfologia óssea apresentada ao redor dos implantes inseridos nos animais pertencentes ao grupo 45 dias (implantes instalados 45 dias após a suspensão do tratamento com alendronato).

DISCUSSÃO

As alterações sistêmicas podem influenciar na osseointegração de implantes e afetar a taxa de sucesso a longo prazo. Dentre estas, o uso de medicamentos, particularmente os BF, pode modificar o processo de osseointegração do implante com o tecido ósseo devido a alterações que promove no processo de remodelação (Yildiz et al.²²¹, 2010). Devido à severa supressão da reabsorção e ao efeito sobre a aposição óssea (Fleisch et al.⁷⁹, 1968; Fromigue, Body⁸⁵, 2002), os BF podem alterar a capacidade do tecido ósseo de se integrar ao implante pelo aumento da formação óssea (Viera-Negrón et al.²¹¹, 2008; Meraw et al.¹⁵¹, 1999) e aumento da área e do número de trabéculas ósseas (da Paz et al.⁵³, 2001). Segundo Wang et al.²¹³ (1999) e Viera-Negrón et al.²¹¹ (2008) este efeito pode acelerar e beneficiar a osseointegração, de maneira a possibilitar a instalação de carga em períodos mais precoces. Entretanto, até o momento o conhecimento a respeito da qualidade e conseqüente viabilidade desse tecido ósseo ao redor do implante ainda é escasso.

Os BF são utilizados rotineiramente para o controle de distúrbios osteometabólicos, principalmente a osteoporose/osteopenia onde o processo de reabsorção óssea está potencializado e precisa ser controlado (Eastell et al.⁶⁵, 2011; Allen, Burr³, 2011). O controle dessa distúrbio é extremamente importante, já que o osso fragilizado está mais sujeito à ocorrência de fraturas que provocam dor, limitação funcional e aumento da mortalidade de pacientes idosos (Center et al.³⁷, 1999; Ensrud et al.⁷¹, 2000). Diversos estudos clínicos demonstraram a efetividade desse tratamento, evitando a perda adicional de massa óssea e a ocorrência de fraturas (Donaldsson et al.⁵⁸, 2009; Ensrud et al.⁷⁰, 2004; Black et al.²³, 1996).

Entretanto, a possibilidade de intercorrências pelo uso dos BF parece estar vinculada à severa supressão do processo de remodelação óssea, já demonstrada em diversos estudos (Marx¹⁴⁶, 2003;

Migliorati¹⁵⁴, 2003; Merigo et al.¹⁵², 2006; Goss⁹⁸, 2008; Madrid, Sanz¹⁴³, 2009; Ruggiero et al.¹⁸³, 2009; Odvina et al.¹⁶¹, 2010; Koh et al.¹³⁰, 2010; Borromeo et al.³¹, 2011; Pazianas, Abrahmsen¹⁷⁰, 2011; Allen, Burr³, 2011). Assim, apesar da eficácia terapêutica comprovada (Lieberman et al.¹³⁵, 1995; Bone et al.²⁸, 2004; Russel et al.¹⁸⁷, 2008; Masud¹⁵⁰, 2009; Eastell et al.⁶⁵, 2011), o efeito da droga sobre o processo de remodelação óssea deve ser monitorado.

Apesar de alguns estudos clínicos terem demonstrado que pacientes que utilizam BF orais e possuem implantes dentários (Kasai et al.¹²³, 2009; Bell, Bell¹⁷, 2008; Grant et al.¹⁰⁰, 2008; Jeffcoat¹²¹, 2006; Fugazzotto et al.⁸⁹, 2007) raramente apresentam lesões de osteonecrose nos maxilares, aumento do índice de perda de implantes (Bedogni et al.¹⁶, 2010; Stark, Epker²⁰³, 1995; Yip et al.²²², 2012; Yuan et al.²²⁵, 2012;) ou de complicações após procedimentos de enxertia óssea, tais resultados devem ser vistos com cautela. Devido a algumas características desses estudos, como análise retrospectiva por meio de fichas clínicas, número pequeno de participantes, ausência de grupo controle e curto período de tratamento e acompanhamento dos pacientes, não é possível afirmar que a instalação de implantes em pacientes que utilizam BF seja isenta de intercorrências (Madrid, Sanz¹⁴³, 2009). Sendo a dosagem e o tempo de tratamento com BF primordial para a ocorrência de complicações (Ruggiero et al.¹⁸³, 2009), estes estudos devem ser avaliados com cuidado, já que o perfil do paciente que utiliza esta classe de medicamentos geralmente o faz por diversos anos (Black et al.²⁵, 2006).

O uso de marcadores bioquímicos para avaliação do processo de remodelação óssea vem sendo indicado por diversos propósitos (Gonnelli et al.⁹⁷, 2007; Eekman et al.⁶⁹, 2011). Sua utilização é de grande valia para avaliar a efetividade do BF sobre a condição osteometabólica em tratamento (Eastell et al.⁶², 2003; Binkley et al.²², 2009; Delmas et al.⁵⁵, 2009) ou para o monitoramento dos pacientes

quanto à adesão ao tratamento, sendo este um frequente problema encontrado (Siris et al.²⁰¹, 2009; Yood et al.²²³, 2003). Porém, a utilização de apenas um marcador bioquímico de reabsorção óssea, como proposto por Marx et al.¹⁴⁷ (2007), não é capaz de determinar se o processo de remodelação óssea retornou ao normal ou qual o risco do paciente apresentar intercorrências (Novince et al.¹⁶⁰, 2009; Hellstein et al.¹¹², 2011).

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da interrupção do tratamento com BF sobre a remodelação óssea, avaliada por meio de marcadores bioquímicos de formação (OCN e P1NP) e de reabsorção (CTX), e sobre o processo de osseointegração de implantes.

Neste estudo, o emprego do BF resultou em aumento na densidade mineral óssea quando comparado ao grupo controle. Isto ocorre devido ao fato que o BF inibe a reabsorção óssea, permitindo maior deposição de matriz e sua mineralização, o que reflete no aumento da densidade óssea (Boivin et al.²⁶, 2000; Roschger et al.¹⁸², 2001; Burr et al.³⁵, 2003; Russel et al.¹⁸⁴, 2011). Diversos estudos em ratas ovariectomizadas demonstraram este aumento no fêmur e/ou vértebras após o tratamento com alendronato (Seedor et al.¹⁹⁵, 1991; da Paz et al.⁵³, 2001; Andersson et al.⁶, 2002; Giro et al.⁹⁵, 2007; Giro et al.⁹⁴, 2008). De maneira similar, estudos conduzidos em humanos com osteoporose relataram o aumento na densidade mineral óssea e a diminuição da incidência de fraturas após tratamento com diferentes BF (Cummings et al.⁵¹, 1998; Harris et al.¹¹⁰, 1993; Sawka et al.¹⁹¹, 2005, Chapurlat, Delmas³⁸, 2006).

A avaliação da densidade mineral óssea pela DXA é considerado padrão-ouro para o diagnóstico de osteoporose (Kanis¹²², 2002; Brown, Josse³⁴, 2002; Hodgson et al.¹¹⁴, 2001; Geusens⁹², 2003; Gourlay et al.⁹⁹, 2012), estando principalmente indicado para mulheres acima de 65 e homens acima de 70 anos, mulheres na pós-menopausa e

homens com idade inferior a 70 anos com fatores de risco para ocorrência de fraturas (Lewieck et al.¹³⁴, 2008). É um exame de extrema importância já que a densidade óssea é correlacionada diretamente com a resistência do tecido ósseo e pode ser utilizada para prever o risco à fratura (Eastell et al.⁶⁵, 2011; Cummings et al.⁵¹, 1998; Bilezikian et al.²⁰, 2009), além de ser empregada para monitorar o paciente em tratamento com BF (Gourlay et al.⁹⁹, 2012; Frost et al.⁸⁶, 2009).

A maioria dos estudos em humanos e animais demonstra a diminuição dos valores de densidade mineral óssea após a suspensão do tratamento com BF (Yildiz et al.²²¹, 2010; Silva et al.¹⁹⁸, 2011; Wasnich et al.²¹⁵, 2004; Black et al.²⁵, 2006). Neste estudo a densidade mineral óssea dos grupos que receberam alendronato não diminuiu após a retirada da medicação. Entretanto, deve-se ressaltar que o período máximo de avaliação após a retirada do medicamento foi de 73 dias, fato este que deve ser levado em consideração já que o alendronato possui um efeito duradouro sobre o tecido ósseo. Estudos, em ratas, que avaliaram o resultado da suspensão do alendronato por um período de 4 a 8 meses, demonstraram a manutenção dos níveis de densidade óssea mesmo após a suspensão do medicamento (Shahnazari et al.¹⁹⁷, 2011; Fuchs et al.⁸⁸, 2008).

Apesar da manutenção da densidade óssea, foi constatado que os animais que receberam alendronato apresentaram menores valores dos marcadores bioquímicos, nas amostras coletadas no dia da cirurgia para instalação dos implantes, em comparação ao grupo controle. Esse resultado confirma achados de estudos anteriores de que a utilização de BFs promove alteração no processo de remodelação óssea, tanto de formação quanto de reabsorção (Idris et al.¹¹⁶, 2008; Pozzi et al.¹⁷⁴, 2009; Eastell et al.⁶⁵, 2011).

A avaliação dos níveis de CTX nesse momento, demonstrou um aumento do marcador para os animais submetidos à retirada da

droga, sendo este significativo para o grupo de 28 dias em comparação aos grupos ininterrupto e 0 dias, sendo que após este período os níveis do marcador voltaram a diminuir. Tal resultado pode ser justificado pelo fato que a retirada da droga permite o aumento da atividade osteoclástica, antes suprimida pela ação do medicamento (Bone et al.²⁸, 2004; Wasnich et al.²¹⁵, 2004; Marx et al.¹⁴⁷, 2007). A nova diminuição do marcador pode ser atribuída a uma nova ligação do alendronato ao tecido ósseo, já que este atua por longos períodos. Silva et al.¹⁹⁸, (2011) demonstraram, em humanos, um padrão semelhante aos encontrados neste estudo, onde o aumento do marcador CTX foi seguido pela diminuição de seus níveis após um ano da retirada do alendronato.

A avaliação dos níveis do marcador de formação óssea OCN dos animais que receberam alendronato demonstrou redução em comparação ao controle e a manutenção de níveis inferiores para todos os grupos. Tal fato confirma que os BF exercem seu efeito também sobre o processo de formação óssea podendo, entretanto, ocorrer em uma proporção diferente em relação aos osteoclastos, já que seu efeito se dá principalmente sobre o processo de reabsorção óssea (Giuliani et al.⁹⁶, 1998; Idris et al.¹¹⁶, 2008; Pozzi et al.¹⁷⁴, 2009; Bellido, Plotkin¹⁸, 2011). Sendo a OCN uma proteína liberada durante o processo de mineralização óssea, este pode estar prejudicado quando na presença de BF (Chen et al.⁴⁰, 1996; Wolf²¹⁹, 1996; Gundberg, Nishimoto¹⁰⁵, 1999).

Quanto aos níveis do marcador de formação óssea P1NP, os resultados demonstraram redução após o tratamento com alendronato em comparação ao grupo controle. Este marcador é utilizado para demonstrar a quantidade de colágeno tipo I que está sendo produzido pelo organismo (Singer, Eyren²⁰⁰, 2008; Eastell et al.⁶⁶, 2011). Com a interrupção do tratamento não houve aumento deste marcador nos grupos avaliados, sendo que o grupo de 45 dias demonstrou os menores valores de P1NP em comparação aos animais do grupo controle. Estes

resultados diferem do estudo de Silva et al.¹⁹⁸ (2011), em humanos, que constatou um discreto aumento dos níveis de P1NP após um período de um ano da retirada do alendronato.

A avaliação dos marcadores nas amostras coletadas no dia do sacrifício dos animais, foi constatado para o CTX um resultado semelhante às amostras coletadas no dia da cirurgia para instalação dos implantes. Os grupos 7 e 14 dias apresentaram um aumento nos níveis do marcador quando comparados aos níveis coletados no dia da cirurgia, apresentando valores próximos aos encontrados no grupo controle. Este resultado demonstra que os valores de CTX tiveram seus maiores níveis durante o período de 35 a 42 dias após a remoção do alendronato, sendo que após este período foi constatada nova diminuição. Os grupos ininterrupto e 45 dias demonstraram valores semelhantes entre si e significativamente inferiores aos do grupo CTLE, 7 e 14 dias. O fato que, mesmo após a retirada da droga, o grupo 45 dias apresentou valores de CTX comparáveis ao grupo ininterrupto, sugere uma nova ligação da droga com o tecido ósseo e a manutenção do efeito do medicamento sobre a remodelação óssea. Em humanos, o estudo de Black et al.²⁵ (2006) demonstrou que os níveis de CTX mantiveram-se em níveis semelhantes aos iniciais mesmo após 3 anos da suspensão do tratamento, sendo que somente após esse período houve aumento significativo dos níveis dos marcadores.

Quanto aos níveis de OCN, os resultados demonstraram que, para os animais que receberam tratamento com alendronato, estes foram inferiores ao grupo controle. Para a maioria dos grupos o marcador se manteve no nível avaliado no dia da cirurgia para instalação dos implantes, havendo um aumento para o grupo controle. Tal resultado demonstra a manutenção do efeito da droga sobre o processo de formação óssea, mesmo após o maior período de suspensão do tratamento. Em humanos foi verificado que, nos primeiros três anos após

a suspensão do BF, os níveis do marcador OCN foram mantidos, havendo uma tendência de retorno ao normal com o passar do tempo, embora ainda tenha sido vista alteração após 7 anos da retirada do medicamento (Ravn et al.¹⁷⁵, 1998; Bagger et al.¹², 2003).

A avaliação do P1NP das amostras coletadas no dia do sacrifício dos animais demonstrou um aumento do marcador nos grupos 0 e 7 dias, entretanto sem diferença significativa em relação ao controle. Valores inferiores do marcador foram verificados para os grupos 14, 28 e 45 dias quando comparados à análise realizada no dia da cirurgia para instalação dos implantes, apresentando diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos CTLE e 7 dias. A permanência de baixos valores do marcador P1NP demonstrou que nos grupos 14, 28 e 45 dias, o processo de formação óssea permaneceu alterado mesmo após a suspensão do alendronato por maiores períodos. Esses resultados podem ser comparados a estudos em humanos que demonstraram que, nos anos iniciais após a suspensão do tratamento com BF, os níveis de P1NP se mantiveram abaixo do normal e tenderam a aumentar somente após 5 anos (Grey et al.¹⁰², 2010; Black et al.²⁵, 2006).

Estudos realizados em humanos avaliando a interrupção do BF por mais de 3 anos demonstraram uma tendência de aumento dos marcadores de reabsorção óssea, como NTX (Wasnich et al.²¹⁵, 2004; Bone et al.²⁸, 2004) e CTX (Black et al.²⁵, 2006), e de formação óssea, como fosfatase alcalina óssea (Bone et al.²⁸, 2004; Black et al.²⁵, 2006), OCN (Bagger et al.¹², 2003) e P1NP (Black et al.²⁵, 2006). Um reduzido número de estudos avaliando, em ratas, o efeito da suspensão do tratamento com BF sobre a remodelação óssea, por meio de marcadores bioquímicos, pode ser encontrado na literatura (Tamura et al.²⁰⁷, 2001; Shahnazari et al.¹⁹⁷, 2011). Estes demonstraram que, mesmo suspendendo o BF por períodos de 8 a 12 meses, não houve alteração dos níveis de deoxipiridinolina, os quais permaneceram diminuídos.

Um importante fator a ser considerado ao avaliar o retorno da remodelação óssea é o tipo de BF utilizado, tempo de tratamento com a droga e a patologia que a amostra em estudo apresenta (Eastell et al.⁶⁶, 2011; Saag et al.¹⁸⁸, 2007; Allen, Burr³, 2011).

Segundo alguns estudos, um mês de tratamento com alendronato em ratas é equivalente à aproximadamente 675 dias (1 ano e 10 meses) para um humano adulto (Kilborn et al.¹²⁷, 2002; Spear²⁰², 2000; Heine et al.¹¹¹, 2004; Steppan et al.²⁰⁴, 2005). Em humanos, o tratamento da osteoporose com BF deve ser mantido por 5 anos para pacientes em baixo risco de ocorrência de fraturas e por 10 anos em pacientes de alto risco (Ott¹⁶⁷, 2011; Watts, Diab²¹⁶, 2010). Portanto, o período de tratamento contínuo com a medicação (120 dias) no presente estudo pode ser considerado equivalente ao empregado em humanos. Embora pareça que o período de até 73 dias de suspensão do tratamento com alendronato seja curto, a equivalência de tempo estabelecida entre ratos e humanos demonstra que o maior período avaliado após retirada da droga é comparativo ao relatado em diversos estudos (Bone et al.²⁸, 2004; Ensrud et al.⁷⁰, 2004; Black et al.²⁵, 2006). Portanto, o retorno à remodelação óssea demonstrado por alguns estudos após curto período de tempo (Marx et al.¹⁴⁷, 2007; Ruggiero et al.¹⁸³, 2009) deve ser visto com cautela, pela possibilidade de que isso seja um evento pontual e de curta permanência, como verificado no presente estudo na avaliação do perfil dos marcadores de remodelação óssea.

O novo declínio dos marcadores bioquímicos de remodelação óssea pode ser atribuído ao fato que o alendronato se liga avidamente ao tecido ósseo, podendo atuar por diversos anos (Lin et al.¹³⁸, 1999; Rodan et al.¹⁷⁹, 2004; Nancollas et al.¹⁵⁸, 2006; Cremers, Papapoulos⁴⁸, 2011). Após sua ligação com o tecido ósseo e a inibição osteoclástica, a deposição de matriz óssea pelos osteoblastos faz com que a droga permaneça interiorizada (Lin¹³⁶, 1996; Russel et al.¹⁸⁴, 2011;

Lin et al.¹³⁷, 1991; Masarachia et al.¹⁴⁸, 1996). O alendronato permanece dentro do tecido ósseo por longos períodos principalmente pelo processo de reabsorção óssea estar inibido. Com a suspensão do tratamento, um aumento da atividade do processo de reabsorção óssea ocorre, como verificado nos períodos iniciais deste estudo pelo aumento dos níveis de CTX. Desta maneira os osteoclastos passam novamente a promover a reabsorção óssea e acabam por liberar o alendronato para o meio extracelular. Após a liberação, a droga pode ligar-se novamente ao tecido ósseo, ser interiorizada pelo osteoclasto ou ser lentamente eliminada por via renal (Ravn et al.¹⁷⁶, 2000; Silva et al.¹⁹⁸, 2011; Peris et al.¹⁷¹, 2011; Russel et al.¹⁸⁴, 2011). O declínio dos marcadores de reabsorção e formação óssea, nos períodos mais longos de avaliação, constatados no presente estudo pode ser o resultado da nova atuação do alendronato sobre o processo de remodelação óssea. Este efeito residual e duradouro do BF sobre o tecido ósseo após sua suspensão é relatado pela literatura e pode justificar a interrupção do tratamento após 5 anos em pacientes osteoporóticos com baixo risco à ocorrência de fraturas (Black et al.²⁵, 2006; Ott¹⁶⁷, 2011; Watts, Diab²¹⁶, 2010).

A tíbia de ratos é um local frequentemente utilizado para a avaliação da osseointegração de implantes (Narai, Nagahata¹⁵⁹, 2003; Lee et al.¹³³, 2011). As intercorrências odontológicas advindas do uso de BF podem se apresentar na cavidade oral como lesões de osteonecrose relacionadas, dentre outros fatores, a um processo infeccioso (Migliorati et al.¹⁵⁴, 2003; Marx¹⁴⁶, 2003). A escolha pela instalação dos implantes na tíbia dos animais deve-se ao fato que o objetivo do estudo foi avaliar o retorno da remodelação óssea após a suspensão do tratamento com BF e seu efeito sobre os parâmetros de osseointegração de implantes, e não a ocorrência de lesões osteonecróticas após a instalação de implantes.

No presente estudo, não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto ao percentual de

tecido ósseo em contato com a superfície do implante (BIC). Apesar disso, os grupos que receberam o tratamento com alendronato apresentaram menores valores quando comparados ao grupo controle. Em contraposição, os grupos tratados com alendronato apresentaram maior percentual de osso formado entre as roscas do implante (BAFO) em relação ao grupo CTLE, porém sem diferença estatisticamente significativa. Também foi constatado que o grupo de 45 dias apresentou os menores valores de preenchimento de rosca por tecido ósseo, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 0 dias. Estes resultados estão de acordo com o verificado para os marcadores de formação óssea, onde pode ser visto que os períodos iniciais de retirada da droga apresentam maiores valores dos marcadores e melhores resultados dos parâmetros avaliados ao redor dos implantes. A provável religação da droga ao tecido ósseo pode ser responsável pelo novo declínio dos marcadores e conseqüente redução na formação de tecido ósseo ao redor dos implantes.

Alguns estudos relatam que a condição sistêmica dos animais pode definir o efeito droga sobre a osseointegração. Estes estudos demonstraram que em animais sistemicamente saudáveis o uso do BF em doses inferiores a 1 mg/kg não foi capaz de acelerar e aprimorar o processo de osseointegração e que apenas doses maiores tiveram este efeito (Eberhardt et al.⁶⁸, 2002; Astrand, Aspenberg⁹, 1999; Astrand, Aspenberg¹⁰, 2002). Segundo Yildiz et al.²²¹ (2010), na ausência de alterações do processo de remodelação óssea, como encontrado na osteoporose/osteopenia, a utilização de doses maiores dos BF pode ser necessária para obter uma diferença significativa em relação aos animais controle. De acordo com o autor, parâmetros histométricos de osseointegração de implantes em tíbias de animais submetidos a tratamento com BF demonstraram aumento estatisticamente significativo quando comparados a animais ovariectomizados. Entretanto, nossos resultados são semelhantes ao estudo de Duarte et al.⁶¹ (2005) com ratas

ovariectomizadas, no qual os grupos que receberam 80 dias de alendronato ou 40 dias de alendronato e interrupção por 40 dias não demonstraram diferenças quanto aos parâmetros de BIC e BAFO.

Deve-se chamar a atenção entretanto que, apesar da ausência de diferença quanto aos resultados histométricos deste estudo, o tecido ósseo presente entre as roscas não apresentou características de normalidade nos grupos que receberam alendronato. A presença de matriz amorfa e aparentemente pouco calcificada depositada entre as roscas do implante e a perda de continuidade entre o tecido ósseo residente e o tecido neoformado são fatores alarmantes, sugerindo grande fragilidade desse tecido, o qual poderia resultar em maior taxa de insucesso desses implantes a longo prazo. Estes resultados corroboram os achados de Iwata et al.¹²⁰ (2006), que mostraram que os bifosfonatos nas dosagens clinicamente utilizadas suprimem a formação e a mineralização óssea. Apesar de alguns estudos mostrarem o efeito dos bifosfonatos sobre osteoblastos (Idris et al.¹¹⁶, 2008; Orriss et al.¹⁶⁵, 2009), ainda não está claro se a inibição da formação óssea é resultado direto da ação da medicação ou do efeito indireto pela supressão da reabsorção óssea. Sendo assim, independente dos possíveis efeitos estimuladores dos bifosfonatos sobre os osteoblastos (Giuliani et al.⁹⁶, 1998, von Knoch et al.²¹², 2005, Im et al.¹¹⁷, 2004, Fromigue, Body⁸⁵, 2002), a interação de reabsorção e formação óssea é o fator primordial na determinação dos efeitos da droga sobre a formação óssea in vivo.

Os resultados da avaliação por meio de marcadores demonstram claramente que a alteração no processo de remodelação pode permanecer após a retirada da droga, por um período variável de acordo com diversos fatores, e que tais alterações podem influenciar na manutenção e viabilidade de implantes osseointegrados. Entretanto, estudos de longo prazo de avaliação ainda precisam ser realizados para

que seja conhecido o intervalo de tempo necessário para recuperação do processo de remodelação óssea após o uso de BF.

CONCLUSÃO

Levando em consideração as limitações desse estudo pode-se concluir que:

1. O tratamento com alendronato, e a suspensão deste, alteraram a quantidade de tecido ósseo ao redor dos implantes apenas no grupo 45 dias;
2. Os animais tratados com alendronato demonstraram alterações na qualidade do tecido ósseo ao redor do implante.
3. A suspensão do tratamento com alendronato não permitiu o retorno dos níveis dos marcadores de remodelação óssea aos padrões do grupo controle nos períodos de avaliação mais longos;

REFERÊNCIAS*

* De acordo com o estilo Vancouver.
Disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

1. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65: 369-76.
2. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med.* 1993; 94: 646-50.
3. Allen MR, Burr DB. Bisphosphonate effects on bone turnover, microdamage, and mechanical properties: what we think we know and what we know that we don't know. *Bone.* 2011; 49: 56-65.
4. Allen MR, Iwata K, Sato M, Burr DB. Raloxifene enhances vertebral mechanical properties independent of bone density. *Bone.* 2006; 39: 1130-5.
5. Altundal H, Sayrak H, Yurtsever E, Goker K. Inhibitory effect of alendronate on bone resorption of autogenous free bone grafts in rats. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65: 508-16.
6. Andersson N, Surve VV, Lehto-Axtelius D, et al. Drug-induced prevention of gastrectomy- and ovariectomy-induced osteopaenia in the young female rat. *J Endocrinol.* 2002; 175: 695-703.
7. Armamento-Villareal R, Napoli N, Diemer K, et al. Bone turnover in bone biopsies of patients with low-energy cortical fractures receiving bisphosphonates: a case series. *Calcif Tissue Int.* 2009; 85: 37-44.
8. Aspenberg P, Schilcher J, Fahlgren A. Histology of an undisplaced femoral fatigue fracture in association with bisphosphonate treatment. Frozen bone with remodelling at the crack. *Acta Orthop.* 2010; 81: 460-2.
9. Astrand J, Aspenberg P. Alendronate did not inhibit instability-induced bone resorption. A study in rats. *Acta orthopaedica Scandinavica.* 1999; 70: 67-70.
10. Astrand J, Aspenberg P. Systemic alendronate prevents resorption of necrotic bone during revascularization. A bone chamber study in rats. *BMC Musculoskelet Disord.* 2002; 3:19.

11. Astrom E, Magnusson P, Eksborg S, Soderhall S. Biochemical bone markers in the assessment and pamidronate treatment of children and adolescents with osteogenesis imperfecta. *Acta Paediatr.* 2010; 99: 1834-40.
12. Bagger YZ, Tanko LB, Alexandersen P, Ravn P, Christiansen C. Alendronate has a residual effect on bone mass in postmenopausal Danish women up to 7 years after treatment withdrawal. *Bone.* 2003; 33: 301-7.
13. Baim S, Miller PD. Assessing the clinical utility of serum CTX in postmenopausal osteoporosis and its use in predicting risk of osteonecrosis of the jaw. *J Bone Miner Res.* 2009; 24: 561-74.
14. Balena R, Toolan BC, Shea M, et al. The effects of 2-year treatment with the aminobisphosphonate alendronate on bone metabolism, bone histomorphometry, and bone strength in ovariectomized nonhuman primates. *J Clin Invest.* 1993; 92: 2577-86.
15. Bauss F, Schenk RK, Hort S, Muller-Beckmann B, Sponer G. New model for simulation of fracture repair in full-grown beagle dogs: model characterization and results from a long-term study with ibandronate. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2004; 50: 25-34.
16. Bedogni A, Bettini G, Totola A, Saia G, Nocini PF. Oral bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw after implant surgery: a case report and literature review. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010; 68: 1662-6.
17. Bell BM, Bell RE. Oral bisphosphonates and dental implants: a retrospective study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 66: 1022-4.
18. Bellido T, Plotkin LI. Novel actions of bisphosphonates in bone: preservation of osteoblast and osteocyte viability. *Bone.* 2011; 49: 50-5.
19. Berenson JR, Rosen L, Vescio R, et al. Pharmacokinetics of pamidronate disodium in patients with cancer with normal or impaired renal function. *J Clin Pharmacol.* 1997; 37: 285-90.

20. Bilezikian JP. Efficacy of bisphosphonates in reducing fracture risk in postmenopausal osteoporosis. *Am J Med.* 2009; 122: 14-21.
21. Binderman I, Adut M, Yaffe A. Effectiveness of local delivery of alendronate in reducing alveolar bone loss following periodontal surgery in rats. *J Periodontol.* 2000; 71: 1236-40.
22. Binkley N, Silverman SL, Simonelli C, et al. Monthly ibandronate suppresses serum CTX-I within 3 days and maintains a monthly fluctuating pattern of suppression. *Osteoporos Int.* 2009; 20: 1595-601.
23. Black DM, Cummings SR, Karpf DB, et al. Randomised trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures. Fracture Intervention Trial Research Group. *Lancet.* 1996; 348: 1535-41.
24. Black DM, Delmas PD, Eastell R, et al. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med.* 2007; 356: 1809-22.
25. Black DM, Schwartz AV, Ensrud KE, et al. Effects of continuing or stopping alendronate after 5 years of treatment: the Fracture Intervention Trial Long-term Extension (FLEX): a randomized trial. *JAMA.* 2006; 296: 2927-38.
26. Boivin GY, Chavassieux PM, Santora AC, Yates J, Meunier PJ. Alendronate increases bone strength by increasing the mean degree of mineralization of bone tissue in osteoporotic women. *Bone.* 2000; 27: 687-94.
27. Bonde M, Qvist P, Fledelius C, Riis BJ, Christiansen C. Immunoassay for quantifying type I collagen degradation products in urine evaluated. *Clin Chem.* 1994; 40: 2022-5.
28. Bone HG, Hosking D, Devogelaer JP, et al. Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. *N Engl J Med.* 2004; 350: 1189-99.

29. Bonewald LF. Osteocyte messages from a bony tomb. *Cell Metab.* 2007; 5: 410-1.
30. Boonekamp PM, van der Wee-Pals LJ, van Wijk-van Lennep MM, Thesing CW, Bijvoet OL. Two modes of action of bisphosphonates on osteoclastic resorption of mineralized matrix. *Bone Miner.* 1986; 1: 27-39.
31. Borromeo GL, Tsao CE, Darby IB, Ebeling PR. A review of the clinical implications of bisphosphonates in dentistry. *Aust Dent J.* 2010; 56: 2-9.
32. Breuil V, Cosman F, Stein L, et al. Human osteoclast formation and activity in vitro: effects of alendronate. *J Bone Miner Res.* 1998; 13: 1721-9.
33. Brown JE, Cook RJ, Major P, et al. Bone turnover markers as predictors of skeletal complications in prostate cancer, lung cancer, and other solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97: 59-69.
34. Brown JP, Josse RG. 2002 clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada. *CMAJ.* 2002; 167: 1-34.
35. Burr DB, Miller L, Grynblas M, et al. Tissue mineralization is increased following 1-year treatment with high doses of bisphosphonates in dogs. *Bone.* 2003; 33: 960-9.
36. Carvas JS, Pereira RM, Caparbo VF, et al. A single dose of zoledronic acid reverses the deleterious effects of glucocorticoids on titanium implant osseointegration. *Osteoporos Int.* 2010; 21: 1723-9.
37. Center JR, Nguyen TV, Schneider D, Sambrook PN, Eisman JA. Mortality after all major types of osteoporotic fracture in men and women: an observational study. *Lancet.* 1999; 353: 878-82.
38. Chapurlat RD, Delmas PD. Drug insight: Bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2006; 2: 211-9.

39. Chavassieux PM, Arlot ME, Reda C, Wei L, Yates AJ, Meunier PJ. Histomorphometric assessment of the long-term effects of alendronate on bone quality and remodeling in patients with osteoporosis. *J Clin Invest.* 1997; 100: 1475-80.
40. Chen JT, Hosoda K, Hasumi K, Ogata E, Shiraki M. Serum N-terminal osteocalcin is a good indicator for estimating responders to hormone replacement therapy in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 1996; 11: 1784-92.
41. Chesnut CH, 3rd, Skag A, Christiansen C, et al. Effects of oral ibandronate administered daily or intermittently on fracture risk in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2004; 19: 1241-9.
42. Clezardin P, Benzaid I, Croucher PI. Bisphosphonates in preclinical bone oncology. *Bone.* 2011; 49: 66-70.
43. Coleman RE, McCloskey EV. Bisphosphonates in oncology. *Bone.* 2011; 49: 71-6.
44. Cooper MS, Syddall HE, Fall CH, et al. Circulating cortisone levels are associated with biochemical markers of bone formation and lumbar spine BMD: the Hertfordshire Cohort Study. *Clin Endocrinol.* 2005; 62: 692-7.
45. Coxon FP, Rogers MJ. The role of prenylated small GTP-binding proteins in the regulation of osteoclast function. *Calcif Tissue Int.* 2003; 72: 80-4.
46. Crandall CJ, Miller-Martinez D, Greendale GA, Binkley N, Seeman TE, Karlamangla AS. Socioeconomic status, race, and bone turnover in the Midlife in the US Study. *Osteoporos Int.* 2012; 23: 1503-12.
47. Cremers S, Farooki A. Biochemical markers of bone turnover in osteonecrosis of the jaw in patients with osteoporosis and advanced cancer involving the bone. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1218: 80-7.

48. Cremers S, Papapoulos S. Pharmacology of bisphosphonates. *Bone*. 2011; 49: 42-9.
49. Cremers SC, Pillai G, Papapoulos SE. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of bisphosphonates: use for optimisation of intermittent therapy for osteoporosis. *Clin Pharmacokinet*. 2005; 44: 551-70.
50. Crofton PM. Biochemistry of alkaline phosphatase isoenzymes. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1982; 16: 161-94.
51. Cummings SR, Black DM, Thompson DE, et al. Effect of alendronate on risk of fracture in women with low bone density but without vertebral fractures: results from the Fracture Intervention Trial. *JAMA*. 1998; 280: 2077-82.
52. D'Aoust P, McCulloch CA, Tenenbaum HC, Lekic PC. Etidronate (HEBP) promotes osteoblast differentiation and wound closure in rat calvaria. *Cell Tissue Res*. 2000; 302: 353-63.
53. da Paz LH, de Falco V, Teng NC, dos Reis LM, Pereira RM, Jorgetti V. Effect of 17beta-estradiol or alendronate on the bone densitometry, bone histomorphometry and bone metabolism of ovariectomized rats. *Braz J Med Biol Res*. 2001; 34: 1015-22.
54. Dayer R, Brennan TC, Rizzoli R, Ammann P. PTH improves titanium implant fixation more than pamidronate or renutrition in osteopenic rats chronically fed a low protein diet. *Osteoporos Int*. 2010; 21: 957-67.
55. Delmas PD, Munoz F, Black DM, et al. Effects of yearly zoledronic acid 5 mg on bone turnover markers and relation of PINP with fracture reduction in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 2009; 24: 1544-51.
56. Delmas PD, Rizzoli R, Cooper C, Reginster JY. Treatment of patients with postmenopausal osteoporosis is worthwhile. The position of the International Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int*. 2005; 16: 1-5.

57. Dominguez LJ, Di Bella G, Belvedere M, Barbagallo M. Physiology of the aging bone and mechanisms of action of bisphosphonates. *Biogerontology*;12:397-408.
58. Donaldsson MG, Palermo L, Schousboe JT, Ensrud KE, Hochberg MC, Cummings SR. FRAX and risk of vertebral fractures: the fracture intervention trial. *J Bone Miner Res.* 2009; 24: 1793-9.
59. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol.* 1982; 11: 318-26.
60. Drake MT, Cremers SC. Bisphosphonate therapeutics in bone disease: the hard and soft data on osteoclast inhibition. *Mol Interv.* 2010; 10: 141-52.
61. Duarte PM, de Vasconcelos Gurgel BC, Sallum AW, Filho GR, Sallum EA, Nociti FH, Jr. Alendronate therapy may be effective in the prevention of bone loss around titanium implants inserted in estrogen-deficient rats. *J Periodontol.* 2005; 76: 107-14.
62. Eastell R, Barton I, Hannon RA, Chines A, Garnero P, Delmas PD. Relationship of early changes in bone resorption to the reduction in fracture risk with risedronate. *J Bone Miner Res.* 2003; 18: 1051-6.
63. Eastell R, Blumsohn A. The value of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *J Rheumatol.* 1997; 24: 1215-7.
64. Eastell R, Christiansen C, Grauer A, et al. Effects of denosumab on bone turnover markers in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2011; 26: 530-7.
65. Eastell R, Walsh JS, Watts NB, Siris E. Bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis. *Bone.* 2011; 49: 82-8.
66. Eberhardt C, Schwarz M, Kurth AH. High dosage treatment of nitrogen-containing bisphosphonate ibandronate is required for osseointegration of cementless metal implants. *J Orthop Sci.* 2005; 10: 622-6.

67. Eberhardt K, Duckberg S, Larsson BM, Johnson PM, Nived K. Measuring health related quality of life in patients with rheumatoid arthritis--reliability, validity, and responsiveness of a Swedish version of RAQoL. *Scand J Rheumatol.* 2002; 31: 6-12.
68. Eekman DA, Bultink IE, Heijboer AC, Dijkmans BA, Lems WF. Bone turnover is adequately suppressed in osteoporotic patients treated with bisphosphonates in daily practice. *BMC Musculoskelet Disord.* 2011; 12: 167.
69. Ensrud KE, Barrett-Connor EL, Schwartz A, et al. Randomized trial of effect of alendronate continuation versus discontinuation in women with low BMD: results from the Fracture Intervention Trial long-term extension. *J Bone Miner Res.* 2004; 19: 1259-69.
70. Ensrud KE, Thompson DE, Cauley JA, et al. Prevalent vertebral deformities predict mortality and hospitalization in older women with low bone mass. Fracture Intervention Trial Research Group. *J Am Geriatr Soc.* 2000; 48: 241-9.
71. Farley JR, Chesnut CH, 3rd, Baylink DJ. Improved method for quantitative determination in serum of alkaline phosphatase of skeletal origin. *Clin Chem.* 1981; 27: 2002-7.
72. Feher A, Koivunemi A, Koivunemi M, et al. Bisphosphonates do not inhibit periosteal bone formation in estrogen deficient animals and allow enhanced bone modeling in response to mechanical loading. *Bone.* 2010; 46: 203-7.
73. Finkelstein JS, Sowers M, Greendale GA, et al. Ethnic variation in bone turnover in pre- and early perimenopausal women: effects of anthropometric and lifestyle factors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87: 3051-6.
74. Fischer DC, Jensen C, Rahn A, et al. Ibandronate affects bone growth and mineralization in rats with normal and reduced renal function. *Pediatr Nephrol.* 2011; 26: 111-7.

75. Fledelius C, Johnsen AH, Cloos PA, Bonde M, Qvist P. Characterization of urinary degradation products derived from type I collagen. Identification of a beta-isomerized Asp-Gly sequence within the C-terminal telopeptide (alpha1) region. *J Biol Chem.* 1997; 272: 9755-63.
76. Fleisch H, Bisaz S. Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. *Am J Physiol.* 1962; 203: 671-5.
77. Fleisch H, Neuman W. The role of phosphatase and polyphosphates in calcification of collagen. *Helv Physiol Pharmacol Acta.* 1961; 19: 17-8.
78. Fleisch H, Russell RG, Bisaz S, Casey PA, Muhlbauer RC. The influence of pyrophosphate analogues (diphosphonates) on the precipitation and dissolution. *Calcif Tissue Res.* 1968:10-11.
79. Fleisch H, Russell RG, Simpson B, Muhlbauer RC. Prevention by a diphosphonate of immobilization "osteoporosis" in rats. *Nature.* 1969; 223: 211-2.
80. Fleisch HA, Russell RG, Bisaz S, Muhlbauer RC, Williams DA. The inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo. *Eur J Clin Invest.* 1970; 1: 12-8.
81. Fraser LA, Vogt KN, Adachi JD, Thabane L. Fracture risk associated with continuation versus discontinuation of bisphosphonates after 5 years of therapy in patients with primary osteoporosis: a systematic review and meta-analysis. *Ther Clin Risk Manag.* 2011; 7: 157-66.
82. Frediani B, Spreafico A, Capperucci C, et al. Long-term effects of neridronate on human osteoblastic cell cultures. *Bone.* 2004; 35: 859-69.
83. Frith JC, Monkkonen J, Blackburn GM, Russell RG, Rogers MJ. Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta, gamma-

- dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. *J Bone Miner Res.* 1997; 12: 1358-67.
84. Fromigue O, Body JJ. Bisphosphonates influence the proliferation and the maturation of normal human osteoblasts. *J Endocrinol Invest.* 2002; 25: 539-46.
 85. Frost SA, Nguyen ND, Center JR, Eisman JA, Nguyen TV. Timing of repeat BMD measurements: development of an absolute risk-based prognostic model. *J Bone Miner Res.* 2009; 24: 1800-7.
 86. Fuchs RK, Faillace ME, Allen MR, Phipps RJ, Miller LM, Burr DB. Bisphosphonates do not alter the rate of secondary mineralization. *Bone.* 2011; 49: 701-5.
 87. Fuchs RK, Phipps RJ, Burr DB. Recovery of trabecular and cortical bone turnover after discontinuation of risedronate and alendronate therapy in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res.* 2008; 23: 1689-97.
 88. Fugazzotto PA, Lightfoot WS, Jaffin R, Kumar A. Implant placement with or without simultaneous tooth extraction in patients taking oral bisphosphonates: postoperative healing, early follow-up, and the incidence of complications in two private practices. *J Periodontol.* 2007; 78: 1664-9.
 89. Gala Paniagua J, Diaz-Curiel M, de la Piedra Gordo C, Castilla Reparaz C, Torralbo Garcia M. Bone mass assessment in rats by dual energy X-ray absorptiometry. *Br J Radiol.* 1998; 71: 754-8.
 90. Gao Y, Luo E, Hu J, Xue J, Zhu S, Li J. Effect of combined local treatment with zoledronic acid and basic fibroblast growth factor on implant fixation in ovariectomized rats. *Bone.* 2009; 44: 225-32.
 91. Geusens PP. Review of guidelines for testing and treatment of osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep.* 2003; 1: 59-65.
 92. Giro G, Coelho PG, Sales-Pessoa R, Pereira RM, Kawai T, Orrico SR. Influence of estrogen deficiency on bone around

- osseointegrated dental implants: an experimental study in the rat jaw model. *J Oral Maxillofac Surg.* 2011; 69: 1911-8.
93. Giro G, Goncalves D, Sakakura CE, Pereira RM, Marcantonio Junior E, Orrico SR. Influence of estrogen deficiency and its treatment with alendronate and estrogen on bone density around osseointegrated implants: radiographic study in female rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105: 162-7.
 94. Giro G, Sakakura CE, Goncalves D, Pereira RM, Marcantonio E, Jr., Orrico SR. Effect of 17beta-estradiol and alendronate on the removal torque of osseointegrated titanium implants in ovariectomized rats. *J Periodontol.* 2007; 78: 1316-21.
 95. Giuliani N, Pedrazzoni M, Negri G, Passeri G, Impicciatore M, Girasole G. Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures in vitro and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo. *Bone.* 1998; 22: 455-61.
 96. Gonnelli S, Cadirni A, Caffarelli C, et al. Changes in bone turnover and in bone mass in women with breast cancer switched from tamoxifen to exemestane. *Bone.* 2007; 40: 205-10.
 97. Goss AN. Bisphosphonates and orthodontics. *Aust Orthod J.* 2008; 24: 56-7.
 98. Gourlay ML, Fine JP, Preisser JS, et al. Bone-density testing interval and transition to osteoporosis in older women. *N Engl J Med.* 2012; 366: 225-33.
 99. Grant BT, Amenedo C, Freeman K, Kraut RA. Outcomes of placing dental implants in patients taking oral bisphosphonates: a review of 115 cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 66: 223-30.
 100. Greenspan SL, Emkey RD, Bone HG, et al. Significant differential effects of alendronate, estrogen, or combination therapy on the rate of bone loss after discontinuation of treatment of postmenopausal

- osteoporosis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.* 2002; 137: 875-83.
101. Grey A, Bolland M, Wattie D, Horne A, Gamble G, Reid IR. Prolonged antiresorptive activity of zoledronate: a randomized, controlled trial. *J Bone Miner Res.* 2010; 25: 2251-5.
 102. Grey A, Bolland MJ, Wattie D, Horne A, Gamble G, Reid IR. The antiresorptive effects of a single dose of zoledronate persist for two years: a randomized, placebo-controlled trial in osteopenic postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94: 538-44.
 103. Grier SJ, Turner AS, Alvis MR. The use of dual-energy x-ray absorptiometry in animals. *Invest Radiol.* 1996; 31: 50-62.
 104. Gundberg C, Nishimoto S. Vitamin K dependent proteins of bone and cartilage. In: Seibel MJ, Robins SP, eds. *Dynamics of bone and cartilage.* vol. 1. Amsterdam: Elsevier Science, 1999: 55-70.
 105. Hannon R, Eastell R. Preanalytical variability of biochemical markers of bone turnover. *Osteoporos Int.* 2000; 11: 30-44.
 106. Hanson DA, Weis MA, Bollen AM, Maslan SL, Singer FR, Eyre DR. A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in urine. *J Bone Miner Res.* 1992; 7: 1251-8.
 107. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 2003; 423: 349-55.
 108. Harris H. The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin Chim Acta.* 1990; 186: 133-50.
 109. Harris ST, Gertz BJ, Genant HK, et al. The effect of short term treatment with alendronate on vertebral density and biochemical markers of bone remodeling in early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 76: 1399-406.
 110. Heine VM, Maslam S, Joels M, Lucassen PJ. Prominent decline of newborn cell proliferation, differentiation, and apoptosis in the aging

- dentate gyrus, in absence of an age-related hypothalamus-pituitary-adrenal axis activation. *Neurobiol Aging*. 2004; 25: 361-75.
111. Hellstein JW, Adler RA, Edwards B, et al. Managing the care of patients receiving antiresorptive therapy for prevention and treatment of osteoporosis: executive summary of recommendations from the American Dental Association Council on Scientific Affairs. *J Am Dent Assoc*. 2011; 142: 1243-51.
 112. Hiroi-Furuya E, Kameda T, Hiura K, et al. Etidronate (EHDP) inhibits osteoclastic-bone resorption, promotes apoptosis and disrupts actin rings in isolate-mature osteoclasts. *Calcif Tissue Int*. 1999; 64: 219-23.
 113. Hodgson SF, Watts NB, Bilezikian JP, et al. American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis: 2001 edition, with selected updates for 2003. *Endocr Pract*. 2003; 9: 544-64.
 114. Huja SS, Kaya B, Mo X, D'Atri AM, Fernandez SA. Effect of zoledronic acid on bone healing subsequent to mini-implant insertion. *Angle Orthod*. 2011; 81: 363-9.
 115. Idris AI, Rojas J, Greig IR, Van't Hof RJ, Ralston SH. Aminobisphosphonates cause osteoblast apoptosis and inhibit bone nodule formation in vitro. *Calcif Tissue Int*. 2008; 82: 191-201.
 116. Im GI, Qureshi SA, Kenney J, Rubash HE, Shanbhag AS. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials*. 2004; 25: 4105-15.
 117. Ito M, Chokki M, Ogino Y, et al. Comparison of cytotoxic effects of bisphosphonates in vitro and in vivo. *Calcif Tissue Int*. 1998; 63: 143-7.
 118. Iwamoto J, Miyata A, Sato Y, Takeda T, Matsumoto H. Five-year alendronate treatment outcome in older postmenopausal Japanese

- women with osteoporosis or osteopenia and clinical risk factors for fractures. *Ther Clin Risk Manag.* 2009; 5: 773-9.
119. Iwata K, Li C, Follet H, Phipps A, Burr B. Bisphosphonates suppress periosteal osteoblast activity independently of resorption in rat femur and tibia. *Bone.* 2006; 39: 1053-8.
 120. Jeffcoat MK. Safety of oral bisphosphonates: controlled studies on alveolar bone. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2006; 21: 349-53.
 121. Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet.* 2002; 359: 1929-36.
 122. Kasai T, Pogrel MA, Hossaini M. The prognosis for dental implants placed in patients taking oral bisphosphonates. *J Calif Dent Assoc.* 2009; 37: 39-42.
 123. Kaynak D, Meffert R, Gunhan M, Gunhan O, Ozkaya O. A histopathological investigation on the effects of the bisphosphonate alendronate on resorptive phase following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. *J Periodontol.* 2000; 71: 790-6.
 124. Khan AA, Sandor GK, Dore E, et al. Bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw. *J Rheumatol.* 2009; 36: 478-90.
 125. Khosla S, Burr D, Cauley J, et al. Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 66: 1320-1.
 126. Kilborn SH, Trudel G, Uthoff H. Review of growth plate closure compared with age at sexual maturity and lifespan in laboratory animals. *Contemp Top Lab Anim Sci.* 2002; 41: 21-6.
 127. Knothe Tate ML. "Whither flows the fluid in bone?" An osteocyte's perspective. *J Biomech.* 2003; 36: 1409-24.
 128. Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36: 1-8.

129. Koh JS, Goh SK, Png MA, Kwek EB, Howe TS. Femoral cortical stress lesions in long-term bisphosphonate therapy: a herald of impending fracture? *J Orthop Trauma*. 2010; 24: 75-81.
130. Kraenlitz, Seibel MJ. Measurement of biochemical markers of bone resorption. In: Seibel MJ, Robins SP, eds. *Dynamics of bone and cartilage metabolism*. San Diego: Academic Press, 1999:111-26.
131. Kurth AH, Eberhardt C, Muller S, Steinacker M, Schwarz M, Bauss F. The bisphosphonate ibandronate improves implant integration in osteopenic ovariectomized rats. *Bone*. 2005; 37: 204-10.
132. Lee SJ, Oh TJ, Bae TS, et al. Effect of bisphosphonates on anodized and heat-treated titanium surfaces: an animal experimental study. *J Periodontol*. 2011; 82: 1035-42.
133. Lewiecki EM, Baim S, Binkley N, et al. Report of the International Society for Clinical Densitometry 2007 Adult Position Development Conference and Official Positions. *South Med J*. 2008; 101: 735-9.
134. Liberman UA, Weiss SR, Broll J, et al. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. The Alendronate Phase III Osteoporosis Treatment Study Group. *N Engl J Med*. 1995; 333: 1437-43.
135. Lin JH. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone*. 1996; 18: 75-85.
136. Lin JH, Duggan DE, Chen IW, Ellsworth RL. Physiological disposition of alendronate, a potent anti-osteolytic bisphosphonate, in laboratory animals. *Drug Metab Dispos*. 1991; 19: 926-32.
137. Lin JH, Russell G, Gertz B. Pharmacokinetics of alendronate: an overview. *Int J Clin Pract*. 1999; 101: 18-26.
138. Lipton A, Cook R, Saad F, et al. Normalization of bone markers is associated with improved survival in patients with bone metastases from solid tumors and elevated bone resorption receiving zoledronic acid. *Cancer*. 2008; 113: 193-201.

139. Little DG, McDonald M, Bransford R, Godfrey CB, Amanat N. Manipulation of the anabolic and catabolic responses with OP-1 and zoledronic acid in a rat critical defect model. *J Bone Miner Res.* 2005; 20: 2044-52.
140. Liu SH, Yang RS, al-Shaikh R, Lane JM. Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review. *Clin Orthop Relat Res.* 1995: 265-78.
141. Lowik CW, van der Pluijm G, van der Wee-Pals LJ, van Treslong-De Groot HB, Bijvoet OL. Migration and phenotypic transformation of osteoclast precursors into mature osteoclasts: the effect of a bisphosphonate. *J Bone Miner Res.* 1988; 3: 185-92.
142. Madrid C, Sanz M. What impact do systemically administrated bisphosphonates have on oral implant therapy? A systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20: 87-95.
143. Magnusson P, Larsson L, Magnusson M, Davie MW, Sharp CA. Isoforms of bone alkaline phosphatase: characterization and origin in human trabecular and cortical bone. *J Bone Miner Res.* 1999; 14: 1926-33.
144. Marin L, Koivula MK, Jukkola-Vuorinen A, Leino A, Risteli J. Comparison of total and intact aminoterminal propeptide of type I procollagen assays in patients with breast cancer with or without bone metastases. *Ann Clin Biochem.* 2011; 48: 447-51.
145. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 61: 1115-7.
146. Marx RE, Cillo JE, Ulloa JJ. Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65: 2397-410.

147. Masarachia P, Weinreb M, Balena R, Rodan GA. Comparison of the distribution of ³H-alendronate and ³H-etidronate in rat and mouse bones. *Bone*. 1996; 19: 281-90.
148. Mashiba T, Hirano T, Turner CH, Forwood MR, Johnston CC, Burr DB. Suppressed bone turnover by bisphosphonates increases microdamage accumulation and reduces some biomechanical properties in dog rib. *J Bone Miner Res*. 2000; 15: 613-20.
149. Masud T, McClung M, Geusens P. Reducing hip fracture risk with risedronate in elderly women with established osteoporosis. *Clin Interv Aging*. 2009; 4: 445-9.
150. Meraw SJ, Reeve CM, Wollan PC. Use of alendronate in peri-implant defect regeneration. *J Periodontol*. 1999; 70: 151-8.
151. Merigo E, Manfredi M, Meleti M, et al. Bone necrosis of the jaws associated with bisphosphonate treatment: a report of twenty-nine cases. *Acta Biomed*. 2006; 77: 109-17.
152. Merry AH, Harwood R, Woolley DE, Grant ME, Jackson DS. Identification and partial characterisation of the non-collagenous amino- and carboxyl-terminal extension peptides of cartilage procollagen. *Biochem Biophys Res Commun*. 1976; 71: 83-90.
153. Migliorati CA. Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 4253-4.
154. Mitchell DY, St Peter JV, Eusebio RA, et al. Effect of renal function on risedronate pharmacokinetics after a single oral dose. *Br J Clin Pharmacol*. 2000; 49: 215-22.
155. Monkkonen H, Auriola S, Lehenkari P, et al. A new endogenous ATP analog (Apppl) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. *Br J Pharmacol*. 2006; 147: 437-45.
156. Murakami H, Takahashi N, Sasaki T, et al. A possible mechanism of the specific action of bisphosphonates on osteoclasts: tiludronate

- preferentially affects polarized osteoclasts having ruffled borders. *Bone*. 1995; 17: 137-44.
157. Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, et al. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone*. 2006; 38: 617-27.
 158. Narai S, Nagahata S. Effects of alendronate on the removal torque of implants in rats with induced osteoporosis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003; 18: 218-23.
 159. Novince CM, Ward BB, McCauley LK. Osteonecrosis of the jaw: an update and review of recommendations. *Cells Tissues Organs*. 2009; 189: 275-83.
 160. Odvina CV, Levy S, Rao S, Zerwekh JE, Rao DS. Unusual mid-shaft fractures during long-term bisphosphonate therapy. *Clin Endocrinol*. 2010; 72: 161-8.
 161. Odvina CV, Zerwekh JE, Rao DS, Maalouf N, Gottschalk FA, Pak CY. Severely suppressed bone turnover: a potential complication of alendronate therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90: 1294-301.
 162. Orrico SR, Giro G, Goncalves D, Takayama L, Pereira RM. Influence of the period after ovariectomy on femoral and mandibular bone density and on induced periodontal disease. *J Periodontol*. 2007; 78: 164-9.
 163. Orrico SR, Goncalves D, Galeazzi ST, Giro G, Takayama L, Pereira RM. The influence of loss of bone mass on induced periodontal disease: a radiographic and densitometric study of female rats. *J Periodontol*. 2005; 76: 1436-42.
 164. Orriss IR, Knight GE, Ranasinghe S, Burnstock G, Arnett TR. Osteoblast responses to nucleotides increase during differentiation. *Bone*. 2006; 39: 300-9.
 165. Ory S, Brazier H, Pawlak G, Blangy A. Rho GTPases in osteoclasts: orchestrators of podosome arrangement. *Eur J Cell Biol*. 2008; 87: 469-77.

166. Ott SM. What is the optimal duration of bisphosphonate therapy? *Cleve Clin J Med.* 2011; 78: 619-30.
167. Parviainen M, Kuronen I, Kokko H, Lakaniemi M, Savolainen K, Mononen I. Two-site enzyme immunoassay for measuring intact human osteocalcin in serum. *J Bone Miner Res.* 1994; 9: 347-54.
168. Pavlos NJ, Xu J, Riedel D, et al. Rab3D regulates a novel vesicular trafficking pathway that is required for osteoclastic bone resorption. *Mol Cell Biol.* 2005; 25: 5253-69.
169. Pazianas M, Abrahamsen B. Safety of bisphosphonates. *Bone.* 2011; 49: 103-10.
170. Peris P, Torra M, Olivares V, et al. Prolonged bisphosphonate release after treatment in women with osteoporosis. Relationship with bone turnover. *Bone.* 2011; 49: 706-9.
171. Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. Dissociation of the proapoptotic effects of bisphosphonates on osteoclasts from their antiapoptotic effects on osteoblasts/osteocytes with novel analogs. *Bone.* 2006; 39: 443-52.
172. Ponte Fernandez N, Estefania Fresco R, Aguirre Urizar JM. Bisphosphonates and oral pathology I. General and preventive aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006; 11:396-400.
173. Pozzi S, Vallet S, Mukherjee S, et al. High-dose zoledronic acid impacts bone remodeling with effects on osteoblastic lineage and bone mechanical properties. *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 5829-39.
174. Ravn P, Christensen JO, Baumann M, Clemmesen B. Changes in biochemical markers and bone mass after withdrawal of ibandronate treatment: prediction of bone mass changes during treatment. *Bone.* 1998; 22: 559-64.
175. Ravn P, Weiss SR, Rodriguez-Portales JA, et al. Alendronate in early postmenopausal women: effects on bone mass during long-term treatment and after withdrawal. *Alendronate Osteoporosis*

- Prevention Study Group. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85: 1492-7.
176. Recker RR, Delmas PD, Halse J, et al. Effects of intravenous zoledronic acid once yearly on bone remodeling and bone structure. *J Bone Miner Res.* 2008; 23: 6-16.
 177. Reid IR, Hosking DJ. Bisphosphonates in Paget's disease. *Bone.* 2011; 49: 89-94.
 178. Rodan G, Reszka A, Golub E, Rizzoli R. Bone safety of long-term bisphosphonate treatment. *Curr Med Res Opin.* 2004; 20: 1291-300.
 179. Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Monkkonen J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone.* 2011; 49: 34-41.
 180. Rogers MJ, Ji X, Russell RG, et al. Incorporation of bisphosphonates into adenine nucleotides by amoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Biochem J.* 1994; 303: 303-11.
 181. Roschger P, Rinnerthaler S, Yates J, Rodan GA, Fratzl P, Klaushofer K. Alendronate increases degree and uniformity of mineralization in cancellous bone and decreases the porosity in cortical bone of osteoporotic women. *Bone.* 2001; 29: 185-91.
 182. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw - 2009 update. *Aust Endod J.* 2009; 35: 119-30.
 183. Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone.* 2011; 49: 2-19.
 184. Russell RG, Bisaz S, Donath A, Morgan DB, Fleisch H. Inorganic pyrophosphate in plasma in normal persons and in patients with hypophosphatasia, osteogenesis imperfecta, and other disorders of bone. *J Clin Invest.* 1971; 50: 961-9.

185. Russell RG, Muhlbauer RC, Bisaz S, Williams DA, Fleisch H. The influence of pyrophosphate, condensed phosphates, phosphonates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxyapatite in vitro and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomised rats. *Calcif Tissue Res.* 1970; 6: 183-96.
186. Russell RG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int.* 2008; 19: 733-59.
187. Saag K, Lindsay R, Kriegman A, Beamer E, Zhou W. A single zoledronic acid infusion reduces bone resorption markers more rapidly than weekly oral alendronate in postmenopausal women with low bone mineral density. *Bone.* 2007; 40: 1238-43.
188. Saha H, Castren-Kortekangas P, Ojanen S, et al. Pharmacokinetics of clodronate in renal failure. *J Bone Miner Res.* 1994; 9: 1953-8.
189. Sato M, Grasser W. Effects of bisphosphonates on isolated rat osteoclasts as examined by reflected light microscopy. *J Bone Miner Res.* 1990; 5: 31-40.
190. Sawka AM, Papaioannou A, Adachi JD, Gafni A, Hanley DA, Thabane L. Does alendronate reduce the risk of fracture in men? A meta-analysis incorporating prior knowledge of anti-fracture efficacy in women. *BMC Musculoskelet Disord.* 2005; 6: 39.
191. Schenk R, Eggli P, Fleisch H, Rosini S. Quantitative morphometric evaluation of the inhibitory activity of new aminobisphosphonates on bone resorption in the rat. *Calcif Tissue Int.* 1986; 38: 342-9.
192. Schibler D, Russell RG, Fleisch H. Inhibition by pyrophosphate and polyphosphate of aortic calcification induced by vitamin D3 in rats. *Clin Sci.* 1968; 35: 363-72.
193. Schwartz HC. Serum CTX testing. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 66: 1319-20.

194. Seedor JG, Quartuccio HA, Thompson DD. The bisphosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. *J Bone Miner Res.* 1991; 6: 339-46.
195. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev.* 2005; 26: 97-122.
196. Shahnazari M, Yao W, Wang B, et al. Differential maintenance of cortical and cancellous bone strength following discontinuation of bone-active agents. *J Bone Miner Res.* 2011; 26: 569-81.
197. Silva AG, Vieira JG, Kunii IS, Lana JM, Lazaretti-Castro M. The effects of discontinuing long term alendronate therapy in a clinical practice setting. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2011; 55: 272-8.
198. Silverman SL. Bisphosphonate use in conditions other than osteoporosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2011; 1218: 33-7.
199. Singer FR, Eyre DR. Using biochemical markers of bone turnover in clinical practice. *Cleve Clin J Med.* 2008; 75: 739-50.
200. Siris ES. Clinical issues with bisphosphonate therapy for osteoporosis. Introduction. *Am J Med.* 2009; 122: 1-2.
201. Spear LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev.* 2000; 24: 417-63.
202. Stark WJ, Epker BN. Failure of osseointegrated dental implants after diphosphonate therapy for osteoporosis: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1995; 10: 74-8.
203. Stepan SJ, Adkins RM, Spinks PQ, Hale C. Multigene phylogeny of the Old World mice, Murinae, reveals distinct geographic lineages and the declining utility of mitochondrial genes compared to nuclear genes. *Mol Phylogenet Evol.* 2005; 37: 370-88.
204. Tahtela R, Tholix E. Serum concentrations of type I collagen carboxyterminal telopeptide (ICTP) and type I procollagen carboxy- and aminoterminal propeptides (PICP, PINP) as markers of metastatic bone disease in breast cancer. *Anticancer Res.* 1996; 16: 2289-93.

205. Tamura Y, Araki A, Chiba Y, Mori S, Hosoi T, Horiuchi T. Remarkable increase in lumbar spine bone mineral density and amelioration in biochemical markers of bone turnover after parathyroidectomy in elderly patients with primary hyperparathyroidism: a 5-year follow-up study. *J Bone Miner Metab.* 2007; 25: 226-31.
206. Tamura Y, Miyakoshi N, Itoi E, et al. Long-term effects of withdrawal of bisphosphonate incadronate disodium (YM175) on bone mineral density, mass, structure, and turnover in the lumbar vertebrae of ovariectomized rats. *J Bone Miner Res.* 2001; 16: 541-9.
207. Teitelbaum SL. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol.* 2007; 170: 427-35.
208. van beek E, Lowik C, van der Pluijm G, Papapoulos S. The role of geranylgeranylation in bone resorption and its suppression by bisphosphonates in fetal bone explants in vitro: A clue to the mechanism of action of nitrogen-containing bisphosphonates. *J Bone Miner Res.* 1999; 14: 722-9.
209. van Beek ER, Cohen LH, Leroy IM, Ebetino FH, Lowik CW, Papapoulos SE. Differentiating the mechanisms of antiresorptive action of nitrogen containing bisphosphonates. *Bone.* 2003; 33: 805-11.
210. Viera-Negron YE, Ruan WH, Winger JN, Hou X, Sharawy MM, Borke JL. Effect of ovariectomy and alendronate on implant osseointegration in rat maxillary bone. *J Oral Implantol.* 2008; 34: 76-82.
211. Von Knoch F, Jaquiere C, Kowalski MO, Schaeren S, Alabre C, Martin L. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials.* 2005; 26: 6941-9.

212. Wang X, Shanbhag AS, Rubash HE, Agrawal CM. Short-term effects of bisphosphonates on the biomechanical properties of canine bone. *J Biomed Mater Res.* 1999; 44: 456-60.
213. Ward LM, Rauch F, Whyte MP, et al. Alendronate for the treatment of pediatric osteogenesis imperfecta: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96: 355-64.
214. Wasnich RD, Bagger YZ, Hosking DJ, et al. Changes in bone density and turnover after alendronate or estrogen withdrawal. *Menopause.* 2004; 11: 622-30.
215. Watts NB, Diab DL. Long-term use of bisphosphonates in osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95: 1555-65.
216. Widler L, Jaeggi KA, Glatt M, et al. Highly potent geminal bisphosphonates. From pamidronate disodium (Aredia) to zoledronic acid (Zometa). *J Med Chem.* 2002; 45: 3721-38.
217. Woitge HW, Pecherstorfer M, Li Y, et al. Novel serum markers of bone resorption: clinical assessment and comparison with established urinary indices. *J Bone Miner Res.* 1999; 14: 792-801.
218. Wolf G. Function of the bone protein osteocalcin: definitive evidence. *Nutr Rev.* 1996; 54: 332-3.
219. Yaffe A, Iztkevich M, Earon Y, Alt I, Lilov R, Binderman I. Local delivery of an amino bisphosphonate prevents the resorptive phase of alveolar bone following mucoperiosteal flap surgery in rats. *J Periodontol.* 1997; 68: 884-9.
220. Yildiz A, Esen E, Kurkcu M, Damlar I, Daglioglu K, Akova T. Effect of zoledronic acid on osseointegration of titanium implants: an experimental study in an ovariectomized rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010; 68: 515-23.
221. Yip JK, Borrell LN, Cho SC, Francisco H, Tarnow DP. Association between oral bisphosphonate use and dental implant failure among middle-aged women. *J Clin Periodontol.* 2012; 39: 408-14.

222. Yood RA, Emani S, Reed JI, Lewis BE, Charpentier M, Lydick E. Compliance with pharmacologic therapy for osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2003; 14: 965-8.
223. Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T. Biochemical markers of bone turnover as predictors of osteoporosis and osteoporotic fractures in men and women: 10-year follow-up of the Taiji cohort. *Mod Rheumatol.* 2011; 21: 608-20.
224. Yuan K, Chen KC, Chan YJ, Tsai CC, Chen HH, Shih CC. Dental Implant Failure Associated With Bacterial Infection and Long-Term Bisphosphonate Usage: A Case Report. *Implant Dent.* 2012; 21: 3-7.
225. Zhao X, Xu X, Guo L, et al. Biomarker alterations with metronomic use of low-dose zoledronic acid for breast cancer patients with bone metastases and potential clinical significance. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 124: 733-43;

ANEXOS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEEA nº 12/2009

Araraquara, 18 de setembro de 2009

Senhores Pesquisadores:

A Coordenadora do CEEA – Comitê de Ética na Experimentação com Animais, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Avaliação do tempo necessário para o restabelecimento do turnover ósseo após tratamento com bisfosfonatos" (Proc. CEEA nº 12/2009) e tendo em vista o cumprimento da pendência dada pelo Relator, AUTORIZA "ad referendum" do Comitê a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para FEVEREIRO/2012.

Atenciosamente,


Profª Drª ELENY ZANELLA BALDUCCI
Coordenadora do CEEA

A
Profª Drª SILVANA REGINA PEREZ ORRICO
DD. Pesquisadora Responsável
a/c Gabriela Giro e Fausto Frizzera Borges Filho
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 16 de março de 2012.

FAUSTO FRIZZERA BORGES FILHO