

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

Mario Henrique Arruda Verzola

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ALENDRONATO, A LONGO PRAZO, SOBRE AS PROPRIEDADES MECÂNICAS DO TECIDO ÓSSEO, SUA REPARAÇÃO E MINERALIZAÇÃO AO REDOR DE IMPLANTES OSSEOINTEGRÁVEIS. ESTUDO EM RATAS.

ARARAQUARA

2014

Mario Henrique Arruda Verzola

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ALENDRONATO, A LONGO PRAZO, SOBRE AS PROPRIEDADES MECÂNICAS DO TECIDO ÓSSEO, SUA REPARAÇÃO E MINERALIZAÇÃO AO REDOR DE IMPLANTES OSSEOINTEGRÁVEIS. ESTUDO EM RATAS.

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Odontologia, Área de Implantodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para a obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Silvana
Regina Perez Orrico

Co-orientadores: Prof. Dr. Roberto
Henrique Barbeiro e Prof. Dr. Paulo
Sergio Cerri

ARARAQUARA

2014

Mario Henrique Arruda Verzola

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ALENDRONATO, A LONGO PRAZO, SOBRE AS PROPRIEDADES MECÂNICAS DO TECIDO ÓSSEO, SUA REPARAÇÃO E MINERALIZAÇÃO AO REDOR DE IMPLANTES OSSEOINTEGRÁVEIS. ESTUDO EM RATAS.

Comissão Julgadora

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientadora: Profa Dra Silvana Regina Perez Orrico

2º Examinador: Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Junior

3º Examinador: Profa Dra Ana Paula de Souza Faloni

4º Examinador: Profa Dra Morgana Rodrihues Guimarães

5º Examinador: Prof. Dr. José Eduardo César Sampaio

Araraquara,

28/03/2014

DADOS CURRICULARES

MARIO HENRIQUE ARRUDA VERZOLA

NASCIMENTO: 02/06/1980 - SÃO CARLOS – SÃO PAULO

FILIAÇÃO: Bernadete Arruda Verzola

Roberto Mario Machado Verzola

2003 / 2006: Graduação em Odontologia

Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP

2008 / 2010: Especialização em Cirurgia e Traumatologia Buco -Maxilo -
Facial

Santa Casa de Misericórdia de Piracicaba

2010 / 2014: Curso de pós-graduação em Odontologia, área de
concentração Implantodontia, nível Doutorado.

Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP

Dedico este trabalho

À Deus,

Por ter me dado uma família maravilhosa... permitir vivenciar as mais diversas situações da vida e poder aprender com cada uma delas...

Aos meus Pais,

Bernadete e Roberto por sempre me apoiarem e serem exemplos... minha mãe buscando sempre mostrar a importância do respeito e da família em nossas vidas... meu pai que é um exemplo de profissional passando à mim e aos meus irmãos uma visão humanista da medicina... o que colaborou para minha formação.

Aos meus irmãos,

Isabela, Ana Cândida, Roberto e Antonio que são grandes irmãos e sempre foram exemplos de médicos comprometidos... sem vocês a vida não teria sentido... que nossa união seja cada vez maior.

À minha namorada Luana,

Que sempre estive ao meu lado sendo mais do que uma namorada... uma amiga, companheira... com a qual divido, todos os dias, muitas alegrias... Saiba que sou extremamente realizado ao seu lado e que sem você essa caminhada não seria tão

gratificante... obrigado pela paciência e atenção que você tem comigo... e acima de tudo muito obrigado por fazer parte da minha vida...te amo!

À minha madrinha,

Margarida por sempre estar presente em minha vida e me apoiar em todos os momentos!!

À minha cunhada ,

Fernanda por sempre ser, não uma cunhada, mas uma irmã para nós... estando conosco durante esses mais de quinze anos, e por sempre estar presente em nossas vidas.

Aos meus cunhados,

Caio e Eduardo por todos os momentos de alegrias e risadas que compartilhamos... obrigado por fazerem dessa família uma família cada vez mais unida...

Aos meus afilhados,

Maria Eduarda e Lucca, por tornarem minha vida mais feliz... muito obrigado pelo carinho!

Aos meus sobrinhos,

Maria Eduarda, Lucas, Henrique e Arthur por serem o nosso motivo de viver e nossas alegrias...!!

Aos meu sogros e cunhada,

José, Mara Sueli e Luara por sempre me receberem com todo carinho em Maringá e terem participado desse momento!!!! Meu muito obrigado!!!!

Agradecimentos

À minha orientadora,

Professora Silvana Regina Perez Orrico pela oportunidade de poder desenvolver esse trabalho. Meu muito obrigado por todos os ensinamentos, pela paciência e, acima de tudo, por sempre ter sido essa pessoa atenciosa e dedicada. Sabemos que não foi fácil chegar até aqui porém conseguimos juntos superar cada uma das dificuldades... Agradeço muito mesmo por esses 4 anos de trabalho e gostaria que soubesse que tenho muita admiração pela Sra.

Ao Professor, amigo e co-orientador,

Roberto H. Barbeiro por ser um exemplo de profissional, com o qual tenho o prazer de acompanhar e trabalhar desde o terceiro ano da faculdade. Seus ensinamentos sempre nortearam meu desenvolvimento como profissional e qualquer palavra seria pouco para retribuir tudo o que o Sr. já fez por mim. Na vida acabamos procurando exemplos profissionais para seguirmos e tenho muito orgulho em tê-lo como exemplo. Muito obrigado por tudo professor!!!!

Ao meu também co-orientador,

Professor Paulo Cerri por sempre ter sido solícito e ter despendido horas de trabalho para me ajudar... Obrigado professor...

Ao meu amigo e parceiro de trabalho,

Fausto Frizzera, com quem morei durante 3 anos, pelas horas e mais horas de trabalho no biotério, pelas risadas e pela grande amizade... a qual será cada vez maior!!!!

Aos Professores do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia,

Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico, Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior, Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiéríci Marcantonio, Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, Profa. Dra. Daniela Zanin por contribuírem para o meu desenvolvimento científico e clínico.

Ao Professor,

Dr. Elcio Marcantonio pelo exemplo de profissionalismo, dedicação ao desenvolvimento da Odontologia e por todas as oportunidades que tenho em aprender com o Sr.

À Professora Gulnara Scaf,

Por ter me orientado durante minha iniciação científica e ter colaborado para que esse momento se tornasse realidade. Obrigado Professora!!!

Ao Professor,

Ubirajara Pereira, do Departamento de Química da USP de São Carlos por ter nos ajudado nas análises de microscopia e mapeamento e por sempre ter sido solícito em nos ajudar. Muito Obrigado

As Professoras.

Keico Nonaca do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e Rosa Maria Pereira do Departamento de Reumatologia da Faculdade de Medicina de São Paulo (USP), por terem colaborado conosco durante todo trabalho.

Aos meus grandes amigos,

Guilherme Oliveira, João Antonio, Jonatas Esteves, Lucas Fontanari, Túlio Durigan, Giovana Anovazzi, Marcell Medeiros, Érica Dorigatti, Rafael Scaf, Andressa Vilas Boas, Telma Bedran, Rubens Moreno, Claudio Marcantonio, Lelis Nicoli, Cássio Rocha, Ligia Araujo, Willian Kabach e Caio Botta pela grande amizade que temos, pelos momentos de conversa e risadas... tenho certeza de que sempre teremos cada vez mais momentos bons!!!! Obrigado por todo companheirismo e parceria!!!

As alunas,

Leslie de Fiori e Luna por terem participado diretamente no dia-a-dia do biotério e cirurgias, muito obrigado!!!

Aos amigos,

Antonio Carlos Ambrizzi, Dario Ambrizzi, Edmur Buzzá, Paulo Afonso, Rodrigo Bracco, Maira Mendonça e Antoni Carlos Cury pelos momentos de trabalho, troca de conhecimento e, o mais importante, pela grande amizade!!!

Aos funcionários,

Zezé, Estér, Regina Lúcia, Isabela, Claudinha, Mara, Alexandre e Leandro por toda ajuda durante todos esses anos... meu muito obrigado.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP,

Representada pela diretora Prof^ª.Dr^a. Andréia Affonso Barretto Montandon, vice diretora Prof^ª. Dr^a. Elaine Maria Sgavioli Massucato e demais funcionários pelo suporte oferecido para o nosso aperfeiçoamento profissional.

Às 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.

*“ A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original.”*

(Albert Einstein)

Resumo

Verzola MHA. Efeito da administração de alendronato, a longo prazo, sobre as propriedades mecânicas do tecido ósseo, sua reparação e mineralização ao redor de implantes osseointegráveis. Estudo em ratas [Tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar, em ratas, o efeito da terapia a longo prazo com bifosfonato sobre o processo de reparo e mineralização óssea ao redor de implantes e sobre as propriedades mecânicas do tecido ósseo. Para isso, 160 ratas foram distribuídas aleatoriamente em 2 grupos: grupo alendronato (ALD), no qual os animais receberam administração subcutânea de alendronato uma vez por semana, e grupo controle (CTL), no qual os animais receberam administração semanal de placebo, durante todo o período experimental. Após 120 dias do início do tratamento, um implante de titânio foi instalado na metáfise tibial, de ambos os lados. Dez animais de cada grupo foram sacrificados nos dias 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 e 60 pós-cirurgia, sendo retirados os fêmures e as tíbias. Os fêmures foram avaliados quanto à densitometria óssea e testes mecânicos. As tíbias contendo os implantes foram avaliadas quanto ao torque de remoção, análise histométrica (%BIC e %BAFO), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS), mapeamento da mineralização além de arranjo e distribuição do colágeno. Os resultados quanto à densitometria óssea demonstraram maiores valores para os animais do grupo ALD em relação ao grupo CTL, em todos os períodos de avaliação, com exceção do período de 15 dias. Os resultados dos testes mecânicos, de forma geral, demonstraram maior resistência à fratura (força máxima) e maior capacidade de absorção de energia (tenacidade) no grupo ALD em relação ao grupo CTL até o período de 45 dias. Para a

rigidez, no período de 45 dias o grupo ALD apresentou valores significativamente maiores, entretanto sem diferença entre os grupos aos 60 dias. Em relação à resiliência, o grupo ALD demonstrou valores significativamente maiores somente no período de 45 dias. A droga influenciou no torque de remoção dos implantes, com valores significativamente maiores para grupo ALD até o período de 30 dias. Para ambos os grupos foi constatado um aumento nos valores do torque de remoção com o avanço nos períodos de observação. A análise histométrica demonstrou que a droga acelerou o processo de reparo, com maiores valores de %BIC e %BAFO para o grupo ALD, nos períodos 20, 30, 45 e 60 dias. As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) demonstraram ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto ao percentual de cálcio (%Ca) e relação cálcio/fósforo (Ca/P). Entretanto, as imagens de mapeamento da mineralização demonstraram, de forma geral, aumento do grau e homogeneidade na mineralização do tecido ósseo do grupo ALD em relação ao CTL. O alendronato interferiu no padrão de arranjo e distribuição do colágeno, resultando em um tecido com menor grau de organização. Pode-se concluir que, apesar da eficácia do alendronato quanto ao aumento e manutenção da densidade mineral óssea, a melhora quanto às propriedades mecânicas não foi mantida ao final do experimento. Embora o alendronato tenha resultado em aumento do torque de remoção e influenciado positivamente no processo de reparo dos implantes, o tecido ósseo formado no grupo ALD apresentou maior grau e homogeneidade da mineralização, além de menor organização do colágeno, quando comparado ao grupo CTL, o que sugere perda da capacidade de remodelação frente às demandas funcionais.

Palavras-chave: Implantes dentários , Densidade óssea, Bifosfonato

Abstract

Verzola MHA Long-term effects of alendronate on bone mechanical properties, repair and mineralization around osseointegrated implants. A rat study [Tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

ABSTRACT

The aim of this study was evaluate in female rats, the effect of long-term therapy with bisphosphonate on the healing process and bone mineralization around implants and on the mechanical properties of bone tissue. One hundred sixty female rats were randomly allocated into two equally sized groups: the alendronate (ALD) group, which received the subcutaneous administration of alendronate (1 mg/kg/week), and the control (CTL) group which the animals received weekly the subcutaneous administration of saline solution (placebo) for the entire experimental period. After 120 days of the treatment initiation, in the booth groups, one titanium implant was installed in the tibia metaphysis. Ten animals in each group were euthanized at: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, or 60 days after surgery, and their femurs and tibias were removed. The femurs were evaluated regarding bone mineral density (BMD), and mechanical tests. The tibias samples with the implants were evaluated by removal torque, histometric analysis (% BIC and % BAFO), scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS), mapping of mineralization and arrangement and distribution of the collagen. The results regarding bone densitometry showed higher values for the animals of ALD group compared with the CTL group at all evaluation periods, except for the period of 15 days. The results of mechanical tests, in general, showed higher fracture resistance (maximum force) and higher capacity of energy absorption (tenacity) in the ALD group compared with the CTL group until the 45 day. In the 45 days, the stiffness showed significantly higher values in the ALD group, however at 60 days no difference

was observed between the groups. Regarding the resilience, the ALD group showed significantly higher values in the 45 days. The drug influenced the removal torque of implants with significantly higher values for ALD group until 30 days. For both groups it was found an increase in removal torque values with advancing during the observation periods. The histometric analysis showed the drug accelerated the repair process, with values higher of the % BIC and % BAFO for the ALD group in the periods: 20,30, 45 and 60 days. The analyses of the scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) demonstrated no statistically difference between the groups for the percentage of calcium (% Ca) and the calcium/phosphorus (Ca / P) relation. However, in general the images the mapping of mineralization showed a increasing the degree and homogeneity in the mineralization of bone tissue in the ALD group compared to the CTL group. Alendronate interfered with standard arrangement and distribution of collagen, resulting in the tissue with a lower grade of organization. We can conclude that despite the effectiveness of alendronate as to increase and maintain bone mineral density, the improvement of the mechanical properties was not maintained to the end of the experiment. Although the alendronate resulted in increased removal torque and positively influenced in the repair process of the implants, the bone tissue formed in the ALD group had a higher grade and homogeneity of mineralization, moreover lesser collagen organization compared to the CTL group, suggesting that loss of ability to remodel for the functional demands.

Key-Words: Dental implants, Bone density, Biphosphonate

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

AAOMS - Associação Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais

AGEs - produtos finais da glicação avançada

ALD - alendronate

AppCH₂p - adenosina 5'-(β,γ -metilenetrifosfato)

ATP - adenosina tri- fosfato

BAFO – Área de tecido ósseo entre as roscas

BFs – bifosfonatos

BIC – Contato Osso/Implante

CTL - controle

CTX - telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I

EDS - espectroscopia de energia dispersiva de raios-X

FPPS - farnesil difosfato sintase

GGPP - geranylgeraniol difosfato

GTPases - proteínas ligantes ao GTP

MEV - microscopia eletrônica de varredura

N - átomo de nitrogênio

-OH - grupo hidroxila

OMAB - osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bifosfonatos

P-C-P - núcleo químico fosfato-carbono-fosfato

P-O-P - núcleo químico fosfato-oxigênio-fosfato

UEBs - unidades estruturais básicas

Sumário

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	23
REVISÃO DE LITERATURA.....	28
PROPOSIÇÃO.....	50
MATERIAL E MÉTODO.....	52
RESULTADO.....	67
DISCUSSÃO.....	106
REFERÊNCIAS.....	118
ANEXOS.....	129

Introdução

INTRODUÇÃO

A manutenção da massa óssea é, principalmente, o resultado do equilíbrio entre a ação dos osteoblastos, responsáveis pela formação óssea, e a ação dos osteoclastos, que agem no processo de reabsorção do tecido ósseo. Diversos fatores podem atuar nos sítios de remodelação, levando ao estímulo e diferenciação destas células. Condições inerentes à idade (menopausa, dificuldade na absorção de nutrientes), uso de medicamentos (corticosteróides), sedentarismo e algumas enfermidades (doença de Paget, osteoporose, mieloma múltiplo, metástase óssea), podem influenciar diretamente no metabolismo do tecido ósseo (Ruggiero et al.⁹⁸, 2009).

Nos últimos 40 anos os bifosfonatos passaram a ser utilizados como tratamento de distúrbios do metabolismo ósseo. O etidronato, sintetizado há mais de 100 anos, foi o primeiro BF a ser utilizado com finalidade médica (Russell¹⁰⁰, 2011). Essas drogas possuem grande afinidade pela hidroxiapatita, ligando-se fortemente à porção mineral do tecido ósseo, apresentam longo tempo de meia vida e são divididos em nitrogenados e não-nitrogenados. Os bifosfonatos que possuem nitrogênio em sua estrutura, agem na inibição da remodelação óssea mediada por osteoclastos, por interferir na prenilação de algumas proteínas formadas na via do mevalonato, pela inibição da enzima farnesilpirofosfato sintase. Essas proteínas regulam processos importantes para a função dos osteoclastos e a organização celular, levando a célula à apoptose e à redução da atividade. Tais efeitos sobre os osteoclastos levam primariamente à inibição da reabsorção e, secundariamente, à diminuição do turnover ósseo (Fleisch³⁰, 2002).

Um dos bifosfonatos mais utilizados atualmente é o alendronato. O fato desse medicamento agir na superfície de reabsorção, diminuindo a atividade dos osteoclastos e acelerando a apoptose dos mesmos (Sato et al.¹⁰⁴, 1990; Masarachia et al.⁷⁰, 1996) fez com que essa droga passasse a ser utilizada no tratamento de pacientes com diminuição da massa óssea proveniente da queda nos níveis de estrógeno, uma vez que esse medicamento promove o aumento na densidade mineral óssea (Watts, Diab¹²¹, 2010).

Entretanto, devido ao aumento na indicação da medicação para diversos fins, seus efeitos sobre a cavidade bucal foram avaliados em alguns estudos. O emprego do alendronato como coadjuvante ao tratamento periodontal não demonstrou efeito significativo sobre a perda óssea alveolar em humanos (Jeffcoat⁵², 2006), entretanto em animais foi verificada redução da perda óssea alveolar com o uso isolado do alendronato (Goes et al.⁴², 2012) ou associado à sinvastatina (Killeen et al.⁵⁵, 2012). Já quando avaliado o efeito do alendronato sobre a osseointegração, foi observado aumento na densidade óssea (Giro et al.⁴⁰, 2008) e torque de remoção dos implantes (Giro et al.⁴¹, 2007; Narai, Nagahata⁷⁹, 2003), além da manutenção da área de contato osso/implante com padrões semelhantes ao de animais controle (Duarte et al.²⁵, 2005; Narai, Nagahata⁷⁹, 2003; Viéra-Negron et al.¹¹⁶, 2008).

Apesar disso, o relato de casos de insucessos de implantes osseointegrados em função na cavidade bucal (Bedogni et al.⁸, 2008; Dello Russo et al.²², 2007; Stark, Epker¹⁰⁸, 1995) e de osteonecrose dos maxilares após procedimentos invasivos na cavidade oral, em pacientes fazendo uso do alendronato e outros bifosfonatos (Bedogni et al.⁸, 2008; Lazarovici et al.⁶², 2010; Von Knoch et al.¹¹⁸, 2005), levantou a dúvida sobre a qualidade do tecido ósseo. Embora a etiologia da osteonecrose dos

maxilares induzida pelo uso de bifosfonatos não tenha sido totalmente estabelecida, uma das hipóteses levantada diz respeito à estagnação da remodelação óssea causada pelo uso do medicamento (Mashiba et al.⁷², 2001). Estudos em animais, nos quais a terapia com alendronato foi empregada, após a osseointegração de implantes, demonstraram que apesar do tratamento melhorar alguns parâmetros do tecido ósseo ao redor dos implantes (Giro et al.⁴¹, 2007; Giro et al.⁴⁰, 2008), a redução da remodelação óssea, vista pela diminuição drástica da taxa de aposição mineral, e a desorganização tecidual (Giro et al.³⁹, 2011), alertam para a possibilidade do comprometimento deste tecido. Também, outros resultados do mesmo grupo (não publicados), avaliando implantes instalados na maxila de animais sob tratamento com alendronato previamente ao procedimento cirúrgico, demonstraram que a droga pode influenciar seriamente o processo de osseointegração. Nesses animais foram verificadas alterações como menor percentual de contato osso/implante, menor área de tecido ósseo entre as roscas, maior número de células em apoptose e a presença de extensas áreas de necrose do tecido ósseo próximo aos implantes.

Outro estudo constatou que, em animais sob tratamento prévio com alendronato, o tecido ósseo apresentava maior número de lacunas vazias, embora fosse observado nos períodos iniciais maior área de tecido ósseo entre as roscas dos implantes (Kim et al.⁵⁶, 2009).

Deve-se atentar para o fato que a maioria dos estudos acima citados, avaliou a quantidade de tecido ósseo em contato com os implantes e a área de tecido ósseo entre as roscas, sendo a qualidade desse tecido pouco abordada.

Segundo Gallacher, Dixon³⁴ (2010), a qualidade do tecido ósseo é influenciada pelo turnover, mineralização, microarquitetura, geometria e acúmulo de dano.

Embora os bifosfonatos sejam drogas amplamente indicadas para controlar a perda de massa óssea, devido às ações de inibição de osteoclastos, redução do turnover ósseo, aumento da massa óssea, aumento da mineralização e possível estímulo de osteoblastos, deve-se lembrar que alguns desses efeitos, particularmente a supressão da remodelação e o aumento da mineralização, podem comprometer a qualidade do tecido ósseo. Tal comprometimento poderia levar ao aumento de *microcracks*, à fragilidade aumentada e à menor capacidade de reparação. Entretanto, tais respostas parecem ser diretamente dependentes do tipo de bifosfonato utilizado, sendo mais prevalente em pacientes sob terapia com alendronato (Gallacher, Dixon³⁴, 2010).

Levando-se em consideração a escassez de estudos avaliando a qualidade do tecido ósseo, em humanos ou animais sob terapia com bifosfonatos, entende-se que mais estudos devam ser desenvolvidos, buscando verificar a ocorrência de alterações na reparação e/ou qualidade do tecido ósseo ao redor de implantes.

Revisão de Literatura

REVISÃO DE LITERATURA

1 Osteoporose

A osteoporose é uma doença esquelética caracterizada pelo desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea. Atinge principalmente mulheres, estando associada ao aumento da idade e à menopausa uma vez que há, nessas situações, uma queda na produção de estrógeno. Esse hormônio contribui para manter o equilíbrio entre os processos de formação e reabsorção óssea, sendo que a redução de seus níveis leva a um quadro em que há o predomínio da reabsorção (de Villiers et al.¹¹⁷, 2013). Uma vez instalada, a osteoporose torna os ossos mais susceptíveis a fraturas, principalmente relacionadas ao quadril e às vértebras (Viera-Negron et al.¹¹⁶, 2008; Rosenthal et al.⁹⁷, 2014; Shane et al.¹⁰⁷, 2014).

Diversas terapias tem sido utilizadas para o tratamento de pacientes com osteoporose, dentre elas pode-se citar a reposição hormonal com estrógeno e a utilização de bifosfonatos (de Villiers et al.¹¹⁷, 2013), sendo que atualmente os BFs são as drogas anti-reabsortivas de primeira escolha no tratamento e controle da osteoporose (Iglesias et al.⁴⁶, 2013; Schwarz et al.¹⁰⁶, 2014), uma vez que promovem aumento da densidade mineral óssea (Ayan et al.⁷, 2012; Yıldız et al.¹²⁴, 2010; Iwamoto et al.⁴⁸, 2013)

2 Bifosfonatos

O histórico de desenvolvimento dos bifosfonatos (BFs) data de longo tempo. O primeiro BF foi sintetizado em 1800. Inicialmente esses compostos eram utilizados como inibidores de corrosão, fertilizantes e na indústria têxtil. Somente nos últimos 40 anos os bifosfonatos passaram a ser utilizados como tratamento de distúrbios do metabolismo ósseo. O etidronato, sintetizado há mais de 100 anos, foi o primeiro BF a ser utilizado com finalidade médica (Russell ¹⁰⁰, 2011).

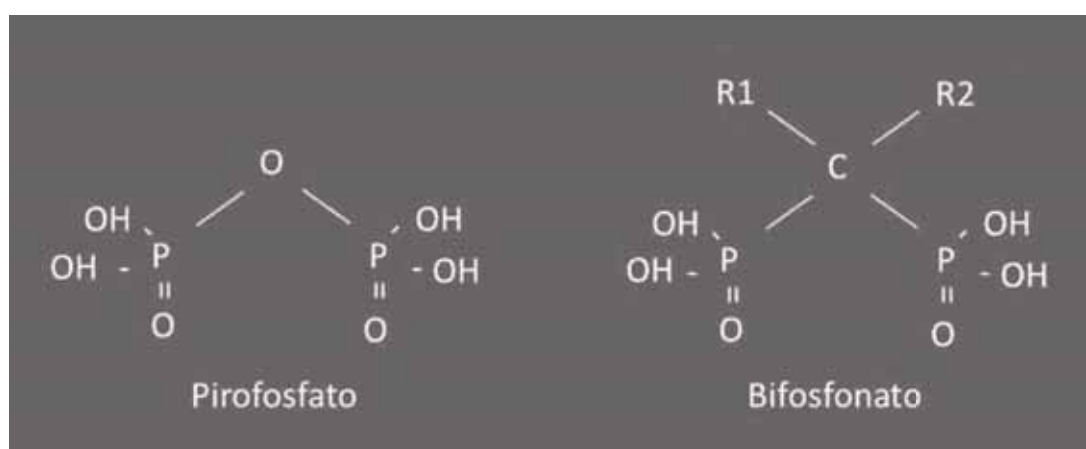
Os bisfosfonatos são análogos do pirofosfato, que compartilham um núcleo químico fosfato-carbono-fosfato (P-C-P) comum. O organismo humano produz substâncias similares aos BF como, por exemplo, o ácido pirofosfórico que possui em sua cadeia principal um grupo fosfato-oxigênio-fosfato (P-O-P). Essas substâncias podem ser encontradas em fluidos corporais, tais como plasma e urina, na forma de pirofosfato (Fleisch, Bisaz³¹, 1962; Russell et al.¹⁰², 1971). Porém, a utilização do pirofosfato como agente terapêutico é restrita, uma vez que essa substância sofre rápida hidrólise enzimática, principalmente quando administrado por via oral (Schibler et al.¹⁰⁵, 1968). Dessa forma, os BFs surgiram como opção terapêutica, por serem análogos sintéticos do pirofosfato e possuírem maior potência e afinidade de ligação com a hidroxiapatita, além de apresentar alta resistência à degradação (Nancolas et al.⁷⁸, 2006).

Esses medicamentos são amplamente utilizados no tratamento de diversas patologias como mieloma múltiplo, doença de Paget, osteoporose, osteopenia, dentre outras. A principal ação desses fármacos é a de inibir a reabsorção óssea (Toker et

al.¹¹¹, 2012; Park et al.⁸³, 2013), resultando em aumento da densidade mineral óssea (McLeod et al.⁷⁴, 2012). Entretanto, segundo Tolia et al.¹¹² (2014), os BFs possuem importante papel também no tratamento de pacientes com neoplasia, agindo tanto de forma preventiva, na ocorrência de metástases ósseas, quanto como agentes auxiliares a tratamentos como radioterapia.

De acordo com Das, Crockett²¹ (2013), essas drogas são fracamente absorvidas pelo trato gastrointestinal (cerca de 10%), sendo excretadas praticamente inalteradas pelos rins. Por possuírem um carbono central na cadeia principal (P-C-P), o qual pode realizar quatro ligações, esses fármacos podem apresentar diversas combinações nos radicais R1 e R2 (Figura 1) os quais irão determinar, respectivamente, a afinidade de ligação do BF com o tecido ósseo e sua potência (Russell et al.¹⁰¹, 2008). Dessa forma os BFs podem ser divididos em duas classes de acordo com a presença ou não de nitrogênio. Cada uma dessas classes têm diferentes alvos intracelulares e mecanismos moleculares de ação, que levam à inibição da reabsorção óssea mediada por osteoclastos (Cooper et al.¹⁸, 2005).

Figura 1 - Estruturas químicas do pirofosfato e dos bifosfonatos



2.1 Bifosfonatos não nitrogenados

A classe de bifosfonatos não-nitrogenados possui como principais exemplos: etidronato, clodronato e tiludronato. A característica principal desses BFs é a de não possuir nitrogênio na cadeia R2, sendo dessa forma considerados pouco potentes. Essa característica estrutural faz com que essa classe de bifosfonatos produza o composto AppCH₂p que possui uma cadeia P-C-P e é um metabólito análogo à adenosina tri-fosfato (ATP) (Rogers et al.⁹⁴, 1994). Ao contrário do que ocorre à molécula de ATP, o AppCH₂p é resistente à hidrólise com a liberação do íon fosfato, interferindo na produção de energia celular. Assim esse metabólito se acumula no meio intracelular dos osteoclastos, competindo com o ATP no metabolismo de energia, levando a célula à apoptose, conseqüentemente resultando na diminuição da reabsorção óssea (Frith et al.³³, 1997; Hiroi et al.⁴⁴, 1999). A utilização dessa classe de Bfs, em casos de tumores com metástases ósseas, requer altas doses da medicação, a qual deve ser injetada lentamente, por longos períodos de tempo evitando, assim, danos renais ao paciente (Ponte Fernandez et al.⁸⁸, 2006).

2.2 Bifosfonatos nitrogenados

A estrutura química dos bifosfonatos dessa classe apresenta nitrogênio em sua composição. O radical R1 tende a ser um grupo hidroxila (-OH) enquanto o radical R2 contém um átomo de nitrogênio (N), o qual pode estar ligado a uma cadeia lateral

de carbono múltipla (alendronato e pamidronato) ou a um grupo heterocíclico (risedronato e zoledronato). De acordo com Russell¹⁰⁰ (2011) estes bisfosfonatos não são metabolizados e nem transformados em análogos não hidrolisáveis de ATP, mas inibem a farnesil difosfato sintase (FPPS), uma enzima da via do mevalonato. Ainda, segundo os mesmos autores, além da biossíntese do colesterol, esta via é responsável pela síntese de farnesil e geranylgeraniol difosfato (GGPP). Essas proteínas são necessárias para a prenilação e localização subcelular correta de enzimas, incluindo as GTPases, que regulam processos críticos para a função dos osteoclastos. Dessa forma, a potência dos bifosfonatos nitrogenados em inibir a atividade da FPPS se correlaciona com a sua capacidade em inibir a reabsorção óssea (Das, Crockett²¹ , 2013), pelo bloqueio da biossíntese de pequenas GTPases, tais como Rac, Cdc42, Ras, Rho, Rab. Estas proteínas são importantes para o processo de sinalização que regulam uma série de eventos celulares necessários para a função dos osteoclastos (Rogers et al.⁹⁵ , 2011). Assim, a ausência da prenilação de algumas proteínas (Cdc42, Rca e Rho) pode levar à eliminação das projeções osteoclásticas (Sato, Grasser¹⁰⁴ , 1990) e alteração do citoesqueleto (Ory et al.⁸² , 2008). Já a alteração das GTPases Rab promove modificação na regulação do movimento de vesículas citoplasmáticas necessárias para a função osteoclástica (Coxon, Rogers¹⁹ , 2003; Pavlos et al.⁸⁵ , 2005). A ocorrência desses eventos pode levar os osteoclastos à apoptose (Park et al.⁸³ , 2013), quando expostos a altas concentrações da droga (Luckman et al.⁶⁶ , 1998; Dunford et al.²⁶ , 2001). Outro importante fator que acarreta apoptose dos osteoclastos é o bloqueio da enzima farnesil difosfato sintase (FDPS), com consequente acúmulo de isopentil pirofosfato (IPP), gerando a produção de um metabólito análogo ao ATP, a adenosina metril- trifosfato (Apppl) (Monkkonen et al.⁷⁷ , 2006).

A classe dos BFs nitrogenados é a mais utilizada no tratamento de doenças metabólicas do tecido ósseo tais como mieloma múltiplo, doença de Paget, osteopenia e osteoporose, por serem mais potentes em relação aos bifosfonatos não nitrogenados. Existem duas vias de administração: a oral e a endovenosa. Os BFs orais são considerados mais fracos quando comparados aos aplicados endovenosamente, isso ocorre porque sua biodisponibilidade é extremamente baixa, basicamente inferior a 1 % para muitos desses BFs e raramente acima dos 5 %, ao contrário dos BFs endovenosos que são absorvidos, praticamente, em sua totalidade (Janner et al.⁵¹, 1991).

2.3 Alendronato

O alendronato (4-amino-1-hidroxybutyidene) é um BF nitrogenado de segunda geração largamente utilizado para tratamento de pacientes com osteopenia ou osteoporose. Sua utilização teve grande crescimento após complicações, dentre elas maior ocorrência de câncer, decorrentes do emprego da terapia de reposição hormonal. Dessa forma, o alendronato surgiu como alternativa de tratamento por apresentar capacidade de reduzir a ocorrência de fraturas em pacientes com osteoporose (Gamsjaeger et al.³⁵, 2013).

3 Ação dos bifosfonatos sobre a remodelação óssea

A remodelação óssea é um fenômeno de superfície, ocorrendo em seres humanos nas superfícies periosteais, endosteais, trabeculares, bem como nos canais

Haversianos (Bullough, Vigorita¹², 1992; Lee, Einhorn⁶³, 2007). O processo de reabsorção e formação torna a idade do tecido ósseo variável, mesmo em um único indivíduo (Boskey, Coleman¹¹, 2010; Paschalis⁸⁴, 2009). Qualquer fator que interfira seja na síntese, qualidade e/ou organização do colágeno deve ser avaliado, pois pode influenciar diretamente na qualidade do tecido ósseo formado e no processo de mineralização. Nesse contexto, o completo entendimento dos efeitos dos BFs sobre o processo de remodelação óssea é muito importante e, por esse motivo, é foco de diversas pesquisas.

A estagnação do processo de remodelação óssea pelos bifosfonatos, ocorre basicamente pela ação da droga sobre osteoclastos e osteoblastos (Russell¹⁰⁰, 2011; Im et al.⁴⁷, 2004). Uma vez que essas células estão diretamente envolvidas no processo de remodelação óssea, faz-se necessário o entendimento do mecanismo de ação dos BFs sobre o mesmo.

No caso específico da osteoporose em idosos (homens e mulheres), sabe-se que além do aumento da atividade dos osteoclastos, o mecanismo fisiopatológico mais importante é a redução do número e da atividade dos osteoblastos (Gimble et al.³⁸, 2006; Chan, Duque¹⁵, 2002). Com o envelhecimento, os osteoblastos são substituídos por adipócitos dentro da medula óssea, o que acarreta em significativa diminuição de número, função e sobrevivência dessas células (Gimble et al.³⁸, 2006; Ali et al.², 2005; Marco et al.⁶⁷, 2005). Nesse contexto, Duque, Rivas²⁷ (2007) avaliaram o efeito do alendronato, *in vitro*, sobre a osteoblastogênese. De acordo com os resultados, o alendronato não só induziu altos níveis de diferenciação dos osteoblastos como também aumentou a atividade dos mesmos, o que foi comprovado pela quantidade de mineralização observada na segunda semana após o início dos

experimentos. Segundo os autores, sem a adição do alendronato este nível de mineralização seria visto somente em torno de três semanas. Komatsu et al.⁵⁸ (2013) também observaram aumento, tanto na quantidade como na atividade de osteoblastos, em animais que receberam alendronato.

A avaliação do efeito dos BFs sobre o desenvolvimento de osteoblastos, a partir de células progenitoras isoladas da medula óssea de mulheres com osteoporose, foi estudada por Lindtner et al.⁶⁵ (2014), que observaram aumento significativo na formação dessas células.

Entretanto, os efeitos dos BFs sobre a proliferação e atividade de osteoblastos, relatados em outros estudos, são controversos. Alguns estudos indicam uma diminuição da proliferação e da ação dos osteoblastos em culturas contendo BFs (Reinholz et al.⁹², 2000; Walter et al.¹¹⁹, 2010), enquanto outros estudos demonstraram efeito oposto (Klein et al.⁵⁷, 1998; Im et al.⁴⁷, 2004). Segundo Marolt et al.⁶⁸ (2012), o efeito da droga está na dependência de sua concentração, sendo que baixas concentrações de bifosfonato (10^{-5} M ou inferior) podem resultar em aumento na proliferação e atividade de osteoblastos, enquanto que concentrações mais elevadas (10^{-4} M ou maior) podem ter efeitos opostos. Outros estudos (von Knoch et al.¹¹⁸, 2005; Altundal et al.⁶, 2007) observaram, em culturas de células ósseas, que a utilização de concentrações muito baixas de bisfosfonatos levou ao aumento nos parâmetros de formação óssea. Embora as razões para os resultados conflitantes não estejam totalmente elucidadas, alguns fatores podem contribuir para a ocorrência de resultados antagônicos, dentre esses pode-se citar diferenças nos tipos de células, duração do tratamento, tipo de BFs e concentrações de BFs utilizadas em cada estudo.

Embora o osteoblasto seja diretamente responsável pela produção da matriz orgânica, essa célula não é responsável pelo processo de mineralização como um todo, sendo um facilitador do início desse processo por meio da deposição de matriz colágena e expressão de sinalizadores envolvidos na mineralização (Bullough, Vigorita¹², 1992). Cabe ressaltar que uma vez iniciado o processo de mineralização, a quantidade e a qualidade dos cristais minerais formados podem mudar, durante o processo de maturação óssea, no mesmo indivíduo (Fratzl et al.³², 2004; Boskey, Coleman¹¹, 2010; Paschalis⁸⁴, 2009).

Tão importante quanto investigar a ação dos BFs sobre os osteoblastos é o esclarecimento das vias de ação e efeitos dessas drogas sobre os osteoclastos, alvos principais do medicamento. Devido ao fato que os Bfs são captados e adsorvidos à superfície mineral do tecido ósseo, especialmente em áreas de reabsorção, tais compostos ficam em estreita proximidade com os osteoclastos, sendo internalizados por meio de endocitose. Os Bfs podem afetar a reabsorção mediada por osteoclastos atuando em diversas fases como recrutamento, diferenciação e atividade dessas células, assim como indução de apoptose, sendo tais ações dependentes do tipo de droga utilizada, como relatado anteriormente. Após a captação, podem ocorrer alterações celulares características como a ausência da borda franjada e a ruptura do citoesqueleto, modificações estas relacionadas à ausência de sinalização dependente da prenilação associada a algumas classes de BFs (Russell¹⁰⁰, 2011).

É importante ressaltar que existem evidências que os BPs inibem a diferenciação de osteoclastos a partir de células precursoras, derivadas da medula óssea (van Beek et al.¹¹⁴, 1999). Outros estudos também demonstraram que os bifosfonatos podem reduzir a reabsorção do tecido ósseo devido à inibição da

diferenciação osteoclástica (Meraw et al.⁷⁶, 1999; Pozzi et al.⁸⁹, 2009; Stark, Boocock et al.¹⁰⁹, 1995). Entretanto, de acordo com van Beek et al.¹¹⁴ (1999), em análises in vitro, a inibição da reabsorção óssea pelo alendronato não envolve a alteração do potencial de osteoclastogênese das células precursoras de osteoclastos, sugerindo que os efeitos do alendronato são exercidos na superfície do osso em osteoclastos maduros.

Outra célula importante para o metabolismo do tecido ósseo é o osteócito, considerada uma célula fundamental à homeostase óssea, devido à secreção de moléculas cruciais para a regulação desse processo (Xiong et al.¹²², 2011). Assim, os osteócitos são importantes alvos terapêuticos para doenças osteometabólicas. Entretanto, a compreensão da biologia dessa célula é limitada devido à falta de acesso na matriz calcificada (Kuroshima et al.⁶⁰, 2013). Por estarem, durante anos, localizadas no sistema lacuno/canalicular, essas células podem ser afetadas pelos BFs (Qing et al.⁹⁰, 2012). Assim, Kuroshima et al.⁶⁰ (2013) propuseram avaliar os efeitos do zoledronato sobre a resposta de osteócitos frente a uma única dose de paratormônio (hormônio que estimula a remodelação óssea favorecendo a formação). De acordo com os autores, o tratamento com zoledronato alterou a resposta óssea ao paratormônio, sugerindo a ação da droga sobre os osteócitos. Outros estudos demonstraram que a administração de BF resultou na prevenção da apoptose de osteoblastos e osteócitos induzida por corticóides (Plotkin et al.⁸⁷, 2006; Bellido, Plotkin⁹, 2011).

A interferência dos BFs sobre o metabolismo ósseo pode ser constatada pela redução dos marcadores de reabsorção óssea, como telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (CTX), piridinolina, deoxipiridinolina (DPD) e telopeptídeo

aminoterminal do colágeno tipo I (NTX), e de formação óssea, como fosfatase alcalina, osteocalcina e propeptídeo aminoterminal do colágeno tipo I (P1NP). De acordo com Kunchur et al.⁵⁹ (2009), a redução dos níveis séricos de CTX pode ser quantificada dentro de semanas após o início da terapia com bifosfonatos, podendo chegar a uma redução de 60% após 6 semanas, confirmando assim a ação da droga. Segundo Devogelaer et al.²³ (2013), uma única infusão de ácido zoledrônico é capaz de induzir uma redução significativa e sustentada de marcadores bioquímicos de remodelação óssea.

Cabe lembrar também que o colágeno é um dos componentes mais abundantes do tecido ósseo, representando de 90 a 98% da matriz orgânica (Lazarovici et al.⁶², 2010; Marx et al.⁶⁹, 2007). De acordo com Gao et al.³⁶ (2009), o alendronato leva a um aumento da expressão de marcadores de colágeno tipo II e da proteína aggrecan, além de reduzir a expressão de algumas proteases (MMP1, MMP3 e MMP13), capazes de degradar o colágeno. Segundo Robey, Boskey⁹³ (2008) a aggrecan é uma proteína presente na matriz óssea responsável por sua organização, retenção de água e íons, além de conferir resiliência às forças mecânicas. Kim et al.⁵⁶ (2009) sugeriram que o alendronato pode inibir a degradação da aggrecan, em animais.

Apesar de estabelecido que a qualidade do tecido ósseo está diretamente ligada não somente ao conteúdo mineral, mas também à parcela de constituintes orgânicos, a literatura quanto aos reais efeitos dos BFs sobre o colágeno ainda é escassa.

Assim, a ação dos BFs sobre os diversos constituintes do tecido ósseo levantam dúvidas sobre quais alterações podem ocorrer no metabolismo desse tecido e suas eventuais consequências. De acordo com Allen, Burr⁴ (2011) no início da

terapia com bifosfonatos há uma redução rápida dos locais de remodelação recém-iniciados, combinados ao novo preenchimento dos locais de remodelação pré-existent, o que demonstra que esse medicamento é responsável pelo aumento inicial da massa óssea, frequentemente observado nos tratamentos. Ainda, segundo os autores, a continuidade da terapia com BF reduz a perda de massa e mantém a arquitetura óssea em comparação a indivíduos não tratados. Entretanto, para alguns autores a manutenção do tratamento pode acarretar em danos ao tecido ósseo. Alguns estudos (Yamagami et al.¹²³, 2013; Odvina et al.⁸⁰, 2005; Compston¹⁷, 2011; Shane et al.¹⁰⁷, 2014) demonstraram que a supressão da remodelação pelos bifosfonatos leva ao acúmulo de microfraturas no tecido ósseo. No estudo de Mashiba et al.⁷¹ (2000), o tratamento a longo prazo (12 meses) com risedronato ou alendronato em cães, suprimiu a remodelação óssea intracortical em cerca de 57% a 68%, aumentando assim a ocorrência dos microdanos em cerca de 2 a 3 vezes, levando à uma diminuição da resistência do osso cortical em torno de 20%.

Estudos conduzidos por Mashiba et al.⁷² (2001) e Allen, Burr³ (2007), utilizando modelos animais, demonstraram que qualquer supressão da remodelação está associada à significativos aumentos de microdanos, impedindo dessa forma, a reparação natural do tecido ósseo. Ainda de acordo com os mesmos autores, os danos acumulados parecem estar relacionados à duração da supressão da remodelação e às doses dos agentes. Allen, Burr⁴ (2011), atentam para o fato de que há uma diferença nos valores de microdanos de acordo com a região óssea analisada; assim, o osso cortical apresentaria maiores acúmulos de microdanos em relação ao osso esponjoso, devido à diferença de volume ósseo.

Entretanto, em estudo que avaliou a frequência de microtrincas, em biópsias de íliaco de 50 mulheres pós-menopausa, em tratamento com bifosfonatos (alendronato, risedronato ou pamidronato intravenoso) por pelo menos três anos, os autores não encontraram diferença significativa entre mulheres tratadas e o grupo controle (Chapurlat et al.¹⁶, 2007).

Devido a isso, Yamagami et al.¹²³ (2013) chamam a atenção para o fato que não está claro se os microdanos, nos animais tratados com alendronato, podem refletir os grandes eventos de fraturas atípicas de fêmur em mulheres osteoporóticas pós-menopausa, tratadas com BFs. Tais fraturas têm sido relatadas como uma complicação potencial do tratamento a longo prazo com bifosfonatos (Compston¹⁷, 2011; Rosenthal et al.⁹⁷, 2014; Giannini et al.³⁷, 2013; Shane et al.¹⁰⁷, 2014).

4 Bifosfonatos, mineralização e propriedades mecânicas do tecido ósseo

O efeito dos BFs sobre a mineralização óssea é um assunto que tem despertado interesse. A manutenção de níveis elevados de remodelação óssea, encontrados na osteoporose, reduz a média do grau de mineralização do osso, encurtando a duração da mineralização secundária das unidades estruturais básicas (UEBs). Nesse contexto, as UEBs recém formadas apresentam um grau de mineralização menor, representando cerca de 50 a 60 % da mineralização total esperada (Jowsey⁵³⁻⁵⁴, 1977, 1973). Ao contrário, as UEBs já existentes são totalmente mineralizadas e esta mineralização total corresponde à mineralização média completa e não a uma "hipermineralização", o que implicaria na presença de uma quantidade excessiva de mineral no mesmo volume de tecido ósseo. Segundo Boivin et al.¹⁰ (2000), a presença de uma quantidade mineral maior, em relação ao máximo normal, só é possível na presença de uma matriz menos orgânica.

Alguns autores afirmam que o aumento da mineralização contribui para o aumento da densidade mineral óssea que, por sua vez, está associada ao aumento da resistência e rigidez do osso (Boivin et al.¹⁰, 2000; Roschger et al.⁹⁶, 2001). Entretanto, também tem sido apontado que a maior homogeneidade da mineralização pode permitir a propagação mais rápida de microfissuras (Wasserman et al.¹²⁰, 2005; Currey²⁰, 1990), o que não representaria benefícios mecânicos apesar do aumento na densidade mineral óssea (Jamsa et al.⁵⁰, 2002).

De acordo com Mashiba et al.⁷² (2001), o tratamento de 1 ano com alendronato em cães, aumentou o acúmulo de microdanos reduzindo a resistência e a capacidade de absorção de energia (tenacidade) do osso cortical desses animais. Além disso, segundo Allen et al.⁵ (2008) e Saito et al.¹⁰³ (2008), o uso prolongado de bifosfonatos também induz à formação e acúmulo de produtos finais da glicação avançada (AGEs), que causam fragilidade dos ossos e redução da capacidade dos mesmos em absorver energia (tenacidade) .

Segundo Boivin et al.¹⁰ (2000), uma vez mantida a terapia com BFs há inibição do processo de remodelação, com consequente queda no número de sítios de reabsorção óssea, podendo dessa forma prorrogar a mineralização secundária. Ainda, segundo os autores, dados de mulheres pós-menopausa, que receberam alendronato por 3 anos, mostraram decréscimos na frequência de ativação do processo de remodelação em 87% no 2º ano e de 92% no 3º ano, o que permitiu um aumento da mineralização secundária. Nesse mesmo estudo, foi observado aumento do grau de mineralização de 7,5%, no segundo ano, e de 10,7% no terceiro ano, comparados ao grupo placebo.

A falha de implantes em pacientes fazendo uso a longo prazo de BFs, segundo Subramanian et al.¹¹⁰ (2012), pode ser explicado segundo algumas hipóteses. Dentre essas, as relacionadas às propriedades mecânicas são: comprometimento das propriedades biomecânicas do tecido ósseo; aumento da mineralização; alterações do colágeno; e arquitetura óssea mais homogênea, resultando no aumento da propagação de trincas, como devido à duração da carga durante a função.

5 Bifosfonatos e implantes

A influência dos bifosfonatos sistêmicos sobre as reabilitações implanto-suportadas tem sido amplamente estudada, uma vez que o uso prévio, concomitante ou após procedimentos odontológicos mais invasivos pode levar à ocorrência de osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bifosfonatos (OMAB) (Marx et al.⁶⁹, 2007; Ruggiero et al.⁹⁹, 2009). Nesse contexto, estudos têm sido conduzidos objetivando estabelecer parâmetros quanto ao risco de pacientes, sob terapia com BFs, serem submetidos à cirurgias odontológicas (Zadik et al.¹²⁵, 2012).

Além disso, as reais implicações dos bifosfonatos sobre as reabilitações com implantes dentários é motivo do desenvolvimento de diversos estudos, que visam elucidar como esses medicamentos interferem nos parâmetros de osseointegração e na longevidade de implantes (de Oliveira et al.⁸¹, 2014).

A literatura, quanto à influência do uso de Bfs sobre a osseointegração, é muito vasta. Dentre as variáveis importantes que interferem no resultado desses estudos estão: uso prévio, concomitante ou após a instalação de implantes e forma de ação do medicamento (local ou sistêmica). Nos estudos em animais, o modelo experimental utilizando ovariectomia permite analisar o efeito dos BFs sobre a

osseointegração em quadros de deficiência de estrógeno. Dessa forma, para o melhor entendimento dessas variáveis, a descrição dos estudos que se segue será de acordo com o momento de administração da droga em relação à instalação de implantes.

5.1 Administração de bifosfonatos previamente à instalação de implantes

De acordo com Jacobsen et al.⁴⁹ (2013) e Chadha et al.¹⁴ (2013), existem riscos de falhas de implantes e possível ocorrência de osteonecrose em pacientes sob administração sistêmica prévia de BFs. Zadik et al.¹²⁵ (2012) também atentam para o risco de ocorrência de osteonecrose, após instalação de implantes, em indivíduos que receberam alendronato previamente à cirurgia, mesmo que o tratamento tenha sido suspenso por mais de 2 anos. Os autores ressaltam a importância da identificação dos pacientes de risco por meio da anamnese.

Gupta.⁴³ (2012) relatou a perda de implante instalado em maxila, 4 semanas após a instalação. De acordo com o autor essa perda enfatiza o risco aumentado de falha de implantes em pacientes que sob uso de bifosfonatos orais.

Porém, de acordo com Mattheos et al.⁷³ (2013), que avaliaram o risco de instalação de implantes em pacientes fazendo uso de ácido zoledrônico para tratamento de osteoporose, a administração sistêmica de uma dose única da droga, previamente à cirurgia, parece não trazer riscos ao paciente.

Segundo Gamsjaeger et al.³⁵ (2013), o ácido zoledrônico administrado endovenosamente em humanos, uma vez por ano, durante 3 anos, não exerce quaisquer efeitos adversos sobre as propriedades do tecido ósseo em formação. De

acordo com os autores, a terapia pode resultar em efeitos benéficos à mineralização da matriz óssea, com aumento dos índices de qualidade e maturidade mineral óssea, o que poderia otimizar os parâmetros de osseointegração.

Em modelo de animais ovariectomizados, estudos em que os Bfs foram administrados anteriormente à instalação dos implantes demonstraram que os grupos que receberam alendronato apresentaram resultados histométricos e de densidade óssea radiográfica superiores aos grupos controle, ovariectomia e ovariectomia + alendronato (Viera-Negrón et al.¹¹⁶, 2008).

Já outros estudos em animais não ovariectomizados concluíram que os BFs, administrados sistemicamente antes da instalação dos implantes, não interferiram nos parâmetros de osseointegração ou na taxa de sucesso dos mesmos (Tsetsenekou et al.¹¹³, 2012; Memon et al.⁷⁵, 2012).

5.2 Administração de bifosfonatos durante a instalação de implantes

A administração de bifosfonatos no momento da cirurgia de instalação dos implantes pode ser feita por meio da incorporação desses agentes à superfície. Essa forma de administração é caracterizada pela ação local da droga que inicia no momento da instalação do implante. Em recente revisão, Fazil et al.²⁹ (2014) verificaram que os sistemas de aplicação local de BFs minimizam os efeitos colaterais associados a essas drogas. Portanto, parece razoável inferir que a aplicação local pode ser indicada para pacientes que não necessitam fazer uso sistêmico do medicamento, minimizando assim possíveis efeitos colaterais.

Nesse contexto, alguns autores apontam importantes benefícios à osseointegração em animais que receberam implantes tratados com BFs (Lee et al.⁶⁴, 2011; So-Hee et al.⁶⁴, 2012; Abtahi et al.¹, 2013).

Gao et al.³⁶ (2009) avaliaram, em ratas 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 inferiores quanto aos parâmetros histomorfométricos, mecânicos e de microtomografia computadorizada do osso ao redor do implante, quando comparado aos demais grupos.

Lee et al.⁶⁴ (2011) avaliaram os benefícios da adição do ibandronato à superfície de implantes. Nesses estudo a osseointegração foi avaliada por meio do teste de torque reverso e microtomografia. Os autores concluíram que os implantes tratados com BF levaram a melhores resultados quanto ao torque reverso e densidade do tecido ósseo ao redor do implante.

Gao et al.³⁶ (2009) demonstraram que o alendronato associado à superfície de implantes resultou em aumento da proliferação de osteoblastos e maiores valores dos parâmetros de diferenciação. Alguns estudos também demonstraram que implantes recobertos com BF apresentam um aumento significativo do conteúdo ósseo e melhoria da microarquitetura e da fixação mecânica (Verron et al.¹¹⁵, 2010; Peter et al.⁸⁶, 2005).

Outra forma de análise da ação dos BFs, no momento da instalação dos implantes, é a administração sistêmica da droga. Assim Kurth et al.⁶¹ (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. Segundo os autores, os resultados demonstraram maior percentual de contato osso/implante para o grupo tratado com BF. Resultados semelhantes foram verificados por Duarte et al.²⁵ (2005) empregando alendronato.

Yildiz et al.¹²⁴ (2010) avaliaram, em modelo de animais ovariectomizados, a influência da administração sistêmica de ácido zoledrônico no momento da instalação dos implantes. Segundo os autores, os resultados quanto à análise histométrica, de estabilidade e densitométrica foram significativamente superiores para o grupo de animais que recebeu o medicamento.

O efeito do ácido zoledrônico, em dose única no dia da cirurgia, sobre a osseointegração de implantes instalados em tíbias de coelhos com perda óssea induzida pelo uso de corticóides, foi avaliado por Carvas et al.¹³ (2010). De acordo com os autores, os animais que receberam o ácido zoledrônico apresentaram melhores parâmetros de osseointegração quando comparados ao grupo metilprednisolona, com resultado similar ao grupo controle.

A interferência de BFs administrados sistemicamente, no momento da cirurgia e durante a cicatrização, sobre a crista óssea e o sucesso inicial de implantes, foi avaliada por Memon et al.⁷⁵ (2012) em estudo retrospectivo. O estudo demonstrou que o uso de bifosfonatos orais não afetou a taxa de sucesso inicial, assim como não

trouxe danos à região da crista óssea, em comparação ao grupo sem administração da droga.

5.3 Administração de bifosfonatos após a instalação de implantes

Huja et al.⁴⁵ (2011) avaliaram a osseointegração de mini-implantes, instalados na maxila e mandíbula de cães, tratados ou não com ácido zoledrônico sistêmico após o procedimento cirúrgico. Os autores concluíram que os animais tratados com BFs apresentaram menor taxa de formação óssea, embora tenha ocorrido remodelação óssea ao redor dos implantes, sugerindo que a cicatrização pode ocorrer mesmo em animais em uso de BF mais potente.

Para Abtahi et al.¹ (2013) o uso sistêmico do alendronato pode acarretar em desenvolvimento de osteonecrose, em animais que receberam a droga após a instalação dos implantes.

Em modelo de animais ovariectomizados Narai, Nagahata⁷⁹ (2003) verificaram os efeitos da terapia com alendronato sistêmico sobre o torque de remoção de implantes de titânio comercialmente puro instalados em ratas ovariectomizadas. O início da administração da droga ocorreu após a instalação dos implantes e foi mantido por 30 dias até o sacrifício dos animais. Os resultados demonstraram valores de torque de remoção significativamente superiores para animais tratados com alendronato em comparação aos animais ovariectomizados. Essa diferença, entretanto, não foi significante quando o grupo que recebeu alendronato foi comparado ao controle.

Em outro estudo, Giro et al.⁴¹ (2007) avaliaram o efeito da deficiência de estrógeno sobre o torque de remoção. Segundo os autores, no grupo de animais ovariectomizados o torque de remoção foi estatisticamente menor quando comparado aos grupos controle, cirurgia fictícia, ovariectomia + estrógeno e ovariectomia + alendronato. Já os animais que foram submetidos à ovariectomia e receberam tratamento com alendronato apresentaram torque de remoção maior quando comparados aos demais grupos.

A prevenção da perda de massa óssea ao redor de implantes osseointegrados, em animais ovariectomizados e tratados com reposição hormonal ou alendronato, foi estudada por Giro et al.⁴⁰ (2008). De acordo com os autores, ambas as terapias foram eficazes na prevenção da perda de massa óssea ao redor de implantes osseointegrados.

Segundo Giro et al.³⁹ (2011), que avaliaram a influência da deficiência de estrógeno e seu tratamento com alendronato ou reposição hormonal sobre o tecido ósseo ao redor de implantes previamente instalados, os animais ovariectomizados apresentaram resultados significativamente inferiores quanto aos parâmetros histométricos e de taxa de aposição mineral óssea em comparação aos grupos tratados com alendronato ou estrógeno.

Apesar da extensão dos estudos citados, e embora a maioria demonstre benefícios no uso de BFs associados à instalação de implantes, grande parte dos estudos avaliou somente parâmetros biomecânicos ou de densidade óssea. Como visto, existe uma relativa carência de informação quanto à qualidade, assim como quanto às características estruturais e físicas, tanto do osso basal como do tecido ósseo neoformado ao redor de implantes, em animais sob tratamento a longo prazo com BFs.

Proposição

PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito, da administração a longo prazo, do alendronato sobre as características biomecânicas, o processo de reparo e a mineralização do tecido ósseo ao redor de implantes instalados em tíbia de ratas. Foi também analisado, sistemicamente, o impacto da droga sobre a densidade mineral e as propriedades mecânicas do tecido ósseo.

Material e Método

MATERIAL E MÉTODO

Animais

Nesse estudo foram utilizadas 160 ratas Wistar, com aproximadamente 3 meses de idade, pesando entre 200 e 250g. Os animais foram mantidos em gaiolas de propileno em grupos de 5 animais, sendo 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.

Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (Proc.nº16/2010) (Anexo).

Desenho do estudo

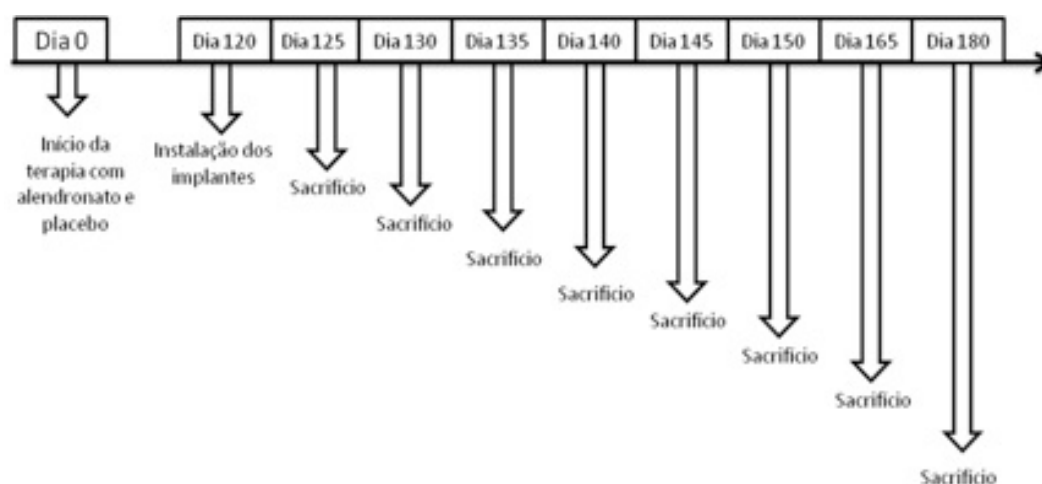
Os animais foram distribuídos de forma aleatória em 2 grupos experimentais: grupo controle (Grupo CTL, n=80) e grupo alendronato (Grupo ALD, n=80).

Os animais do grupo ALD receberam administração subcutânea de alendronato, na concentração de 1mg/Kg/semana, enquanto os animais do grupo CTL receberam administração subcutânea de placebo (solução salina estéril) uma vez por semana. Após 120 dias de tratamento, os animais de ambos os grupos foram submetidos à instalação de um implante de titânio na metáfise tibial, direita e

esquerda. Dez animais de cada grupo foram sacrificados, por aprofundamento da anestesia, nos dias 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 e 60 dias após a instalação dos implantes, como mostrado na Figura 2.

O peso dos animais foi controlado semanalmente durante todo o experimento para averiguação da condição de saúde do animal e para o ajuste da dose da medicação.

Figura 2 - Desenho experimental do estudo



Cirurgia para instalação dos implantes

Os animais foram anestesiados por uma combinação de cloridrato de ketamina (Ketamina Agener – Agener União), na concentração de 0,08ml/100g, e cloridrato de xilazina 2% (Rompum - Bayer), na concentração de 0,04ml/100g de massa corpórea.

Posteriormente, foi realizada a tricotomia da região interna da perna esquerda e a antissepsia com gaze estéril embebida em solução de iodopovidona.

Uma incisão de aproximadamente 10 mm foi realizada, em planos, na região a ser operada, mais precisamente sobre a metáfise tibial (Figura 3). Após dissecação delicada o tecido ósseo foi submetido à osteotomia, realizada por meio de uma seqüência progressiva de fresas (fresa lança; fresa espiral de 2,0 mm), para acomodar um implante de titânio de superfície Master Porous (Conexão Sistema de Prótese) de 4,0 mm de comprimento por 2,2 mm de espessura (Figura 4 a – d). Todas as perfurações foram realizadas com motor elétrico (BLM 600 - Driller) ajustado a 1200 RPM, sob abundante irrigação com solução salina estéril.

Figura 3 - Incisão (a,b) e descolamento do tecido para exposição da região de instalação do implante (c,d).

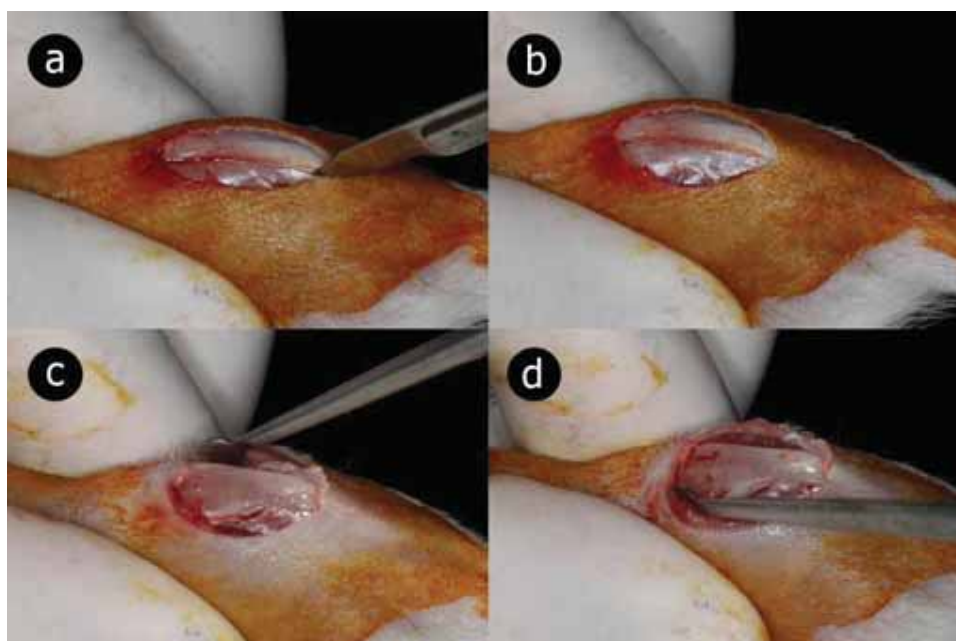
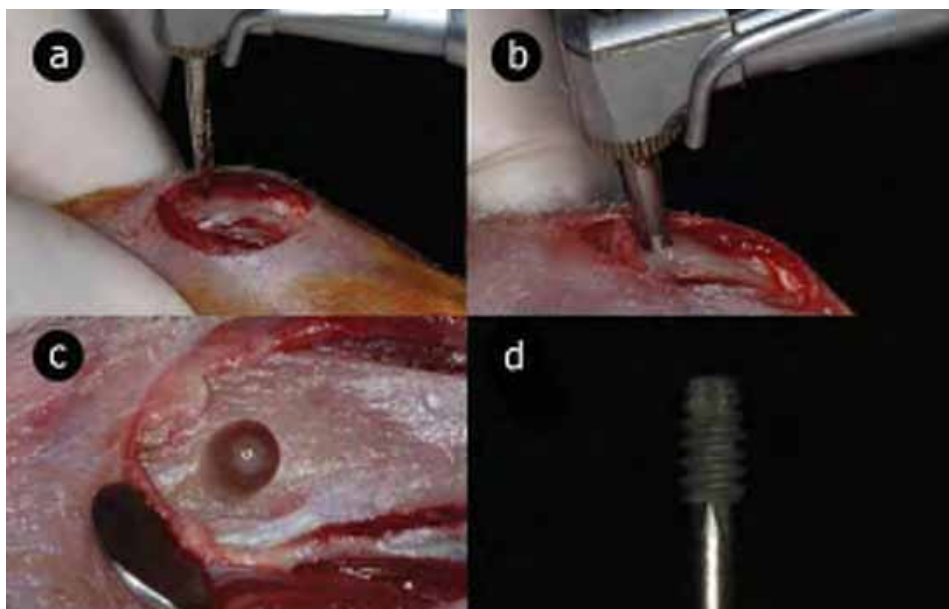
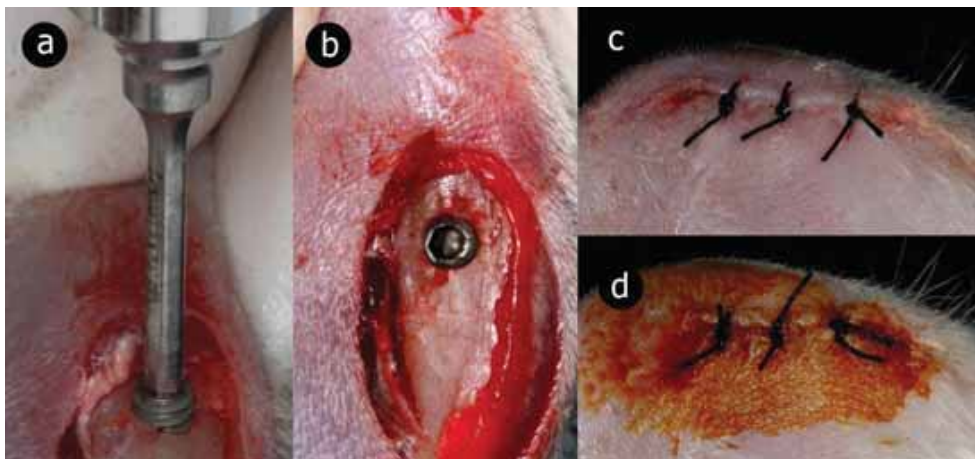


Figura 4 - Perfuração com fresa lança (a) e espiral 2,0 mm (b) sob constante irrigação para criação do leito ósseo (c) para inserção do implante (d).



O implante foi instalado com a ajuda de uma chave hexagonal (Conexão Sistema de Implantes). A região operada foi suturada em planos, internamente com um fio reabsorvível (Vicryl 5-0 – Johnson & Johnson) e externamente com fio de seda (Seda 4-0 - Johnson & Johnson) (Figura 5).

Figura 5 - Instalação do implante com chave hexagonal (a,b), sutura (c) e antissepsia da área operada (d) .



Os animais receberam no pós-operatório, penicilina associada à estreptomicina (Multibiótico Veterinário[®]; Vital Farma Ltda, São Sebastião do Paraíso, MG, Brasil) na dosagem 0,1 ml/kg de peso, em dose única, e corticóide intramuscular na dosagem de 5mg/kg de (Cort-Trat[®]; A Química Santa Marina S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil), por 3 dias consecutivos.

Sacrifício dos animais

Os animais foram sacrificados nos períodos experimentais acima descritos, por aprofundamento da anestesia, sendo removidos as tíbias, direita e esquerda, e o fêmur esquerdo. Os espécimes foram fixados em formaldeído tamponado 4%, durante 24 horas.

Análises

Análise Biomecânica

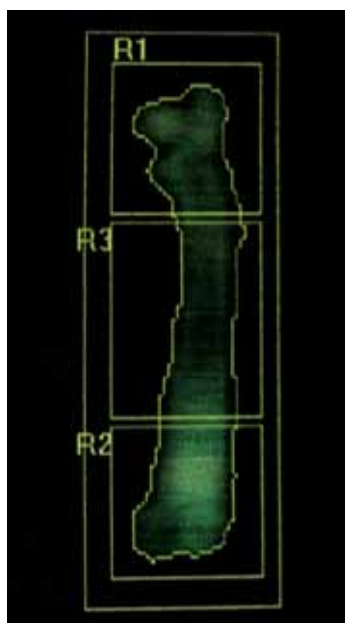
A análise de torque de remoção foi realizada logo após o sacrifício dos animais. As áreas operadas foram reabertas e os implantes expostos. Para essa análise foi empregado um torquímetro digital (Torquímetro digital portátil TQ-680, Instrutherm[®], São Paulo-SP, Brasil), com divisões de 0,1N/cm e escala variando de 0 a 147,1N/cm. Após estabilização da tíbia, uma força no sentido anti-horário foi aplicada até o completo rompimento da interface osso/implante, sendo esse valor registrado automaticamente no display do aparelho e considerado, portanto, como o torque necessário para a ruptura da osseointegração.

Densitometria Óssea

A densidade mineral óssea (BMD) foi avaliada por Dual-energy X-ray Absorptiometry (DXA), em 10 fêmures esquerdos de cada grupo e para cada período de avaliação, para a constatação do efeito sistêmico do medicamento. Para isso foi utilizado um densitômetro (Discovery-A SN: 80999; Hologic Inc, Bedford, USA), empregando-se um software fornecido pelo fabricante do aparelho, para pequenos animais, no modo “High Resolution”. Para calibração do aparelho, foi realizado um teste, o qual consiste em medir a densidade de um bloco padrão (“phantom”) composto por três camadas sintéticas, de constituição semelhante ao osso, com área e conteúdo mineral conhecido. A precisão da DXA, na determinação da BMD, foi avaliada pela mensuração do coeficiente de variação, expresso como uma

porcentagem da média. Para tanto, cinco medidas consecutivas, de uma mesma amostra, foram realizadas na região de interesse, obtendo-se neste estudo um coeficiente de variação de 1,8%. A delimitação das regiões analisadas foi realizada com auxílio de 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 do fêmur, como determinadas na Figura 6.

Figura 6 - Imagem obtida do fêmur por DXA. Delimitação global e das sub-regiões para análise. *R1* - Epífise proximal; *R2* - Epífise distal; *R3* - Diáfise.



Ensaio Mecânico

Após análise da densidade mineral óssea, os fêmures foram submetidos ao ensaio mecânico com auxílio de uma máquina universal de ensaio (Instron®, modelo 4444), cuja célula de carga apresenta capacidade máxima de 100 kg (aproximadamente 1 kN). O osso foi apoiado em dois suportes (dois pontos), sendo a força aplicada em um terceiro ponto, no meio geométrico entre os dois apoios, considerado como o terço médio do fêmur.

No início do teste, uma pré-carga de 5 N foi aplicada por meio de uma haste cilíndrica com um rolete de 3 mm em sua extremidade, no sentido pósterio-anterior e perpendicular ao eixo longitudinal para acomodação da amostra. Após esse procedimento, foi aplicada uma força no mesmo sentido, com velocidade constante de 0,5 cm/min, até o momento da fratura do osso.

Os valores de força máxima, rigidez, tenacidade (capacidade de absorção de energia) e resiliência (capacidade de absorção de energia quando submetidos à cargas) foram registrados automaticamente pelo sistema computacional (software Instron Series IX) pertencente ao aparelho. (tenacidade) no grupo ALD em relação ao grupo CTL até o período de 45 dias.

Preparação dos cortes não descalcificados de tecido ósseo

Após o processo de fixação e lavagem em água corrente, os espécimes relativos à tíbia esquerda foram desidratados em graduações crescentes de soluções de álcool etílico (70° /80° /90° /96° /100%/ 100%).

Após desidratação gradual, a infiltração plástica foi realizada com misturas de glicolmetacrilato (Technovit 7200 VLC, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Alemanha) e álcool etílico, seguindo variações gradativas, com concentração crescente de resina, finalizando com dois banhos de imersão em glicolmetacrilato puro, por 7 dias cada.

Seguinte à infiltração plástica, os espécimes foram incluídos em resina e polimerizados por 10 horas, sendo 4 horas de exposição à luz amarela e 6 horas de exposição à luz azul (EXAKT 520 Light Polymerization Unit, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Alemanha). Seguindo o protocolo descrito por Donath, Breuner²⁴, (1982) o bloco foi, então, removido do molde e montado em uma lâmina acrílica utilizando-se uma resina (Technovit 4000, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Alemanha), com auxílio de uma prensa a vácuo (EXAKT 401, Vacuum Adhesive Press, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Alemanha). Por meio da utilização de um sistema de corte (Exakt Cutting System, Norderstedt, Alemanha), foi realizado um corte preliminar, visando o centro do implante, sendo obtidas duas secções espessas (300 - 500 μm). Uma das secções obtidas foi colada com resina (Technovit 7210 VLC, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Alemanha) a outra lâmina acrílica, utilizando-se uma prensa de precisão (Exakt 402, Precision Adhesive Press). Esta foi submetida novamente ao sistema de corte que resultou em uma secção de aproximadamente 100 μm , sendo então submetida a um sistema de microdesgaste (Exakt 400CS, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Alemanha) até a obtenção da espessura final de aproximadamente 30 μm .

Análise do arranjo e distribuição do colágeno

As lâminas relativas à tíbia esquerda, obtidas como descrito acima, foram coradas com solução de 0,1% de Sirius-Red por 1 hora para avaliação da distribuição e arranjo do colágeno na área de roscas e região adjacente ao implante. As lâminas foram fotografadas com auxílio de um microscópio de polarização (Microscópio Olympus BX51), ao qual estava acoplada uma câmera digital (Câmera Olympus DP71). Dois filtros polarizadores (Filtros polarizadores Olympus U_P110 e U_P115) foram acoplados ao microscópio de luz Olympus (modelo BX-51, Tokio – Japão) para análise das secções coradas com picrosirius. A captura das imagens foi realizada após padronização de fatores como objetiva, intensidade de luz, abertura do diafragma do condensador, altura do condensador e angulação do polarizador. Os parâmetros considerados foram: a presença de colágeno birrefringente e o arranjo e distribuição desse colágeno na região da terceira da rosca dos implantes. A análise foi realizada por um examinador “cego” em relação aos grupos experimentais.

Análise Histométrica

As lâminas coradas com Picrosirius Red foram empregadas para avaliar parâmetros histométricos, como extensão linear de tecido ósseo em contato direto com a superfície do implante (BIC) e fração areal entre as roscas do implante ocupadas por tecido ósseo (BAFO). As mensurações foram realizadas em imagens obtidas previamente com auxílio de um microscópio óptico (LEICA DMLS - Leica Microscopy and Scientific Instruments Group, Wetzlar, Germany), em aumento de 100 vezes. As imagens foram selecionadas e enviadas para um microcomputador

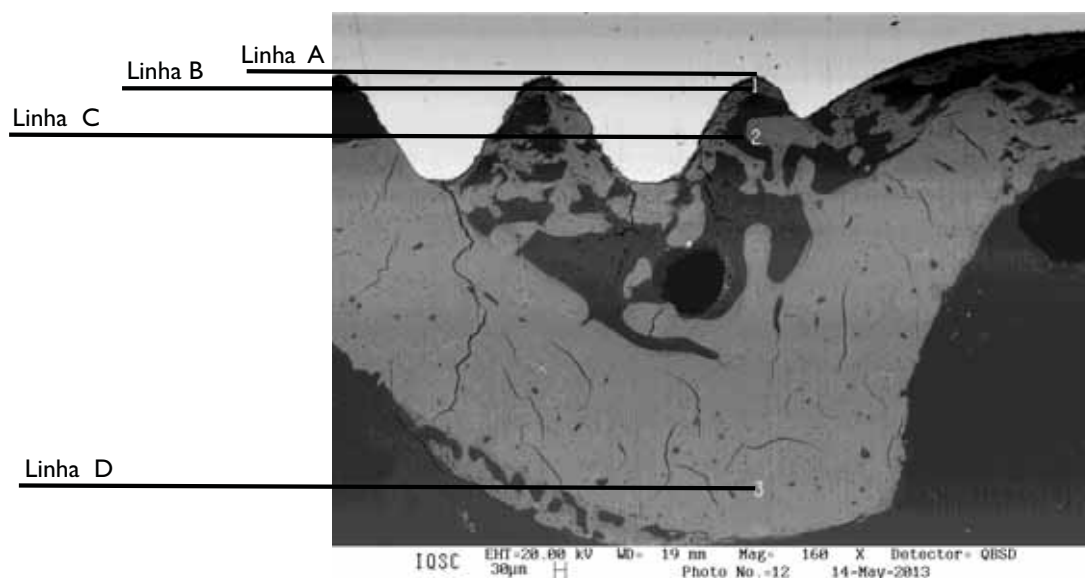
(Intel Core i5 duo, 3.20GHz GHz, 2 Gb RAM) por meio de uma câmera de vídeo (DFC-300 FX 3 megapixel- Leica Microsystems Ltda, Wetzlar, Germany), acoplada ao microscópio óptico. A determinação dos valores foi realizada empregando-se um software analisador de imagens (ImageJ 1.34 - National Institutes of 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 e expressos como percentual da extensão total e área total, respectivamente.

Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva de raios-X - (MEV / EDS)

As amostras referentes à outra secção relativa à tíbia esquerda, obtida após o primeiro corte no sistema EXAKT (Exakt Cutting System, Norderstedt, Alemanha), anteriormente descrito, foram recobertas com carbono em um metalizador (Coating System BAL-TEC MED 020, BAL-TEC, Liechtenstein). Tais amostras foram submetidas à análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para obtenção de fotomicrografias. Esta análise foi realizada empregando-se um microscópio (ZEISS LEO 440 Cambridge, England) com detector OXFORD (model 7060), operando com feixe de elétrons de 20kV. As imagens foram capturadas com feixe de elétrons retroespalhados utilizando-se um detector (FOUR QUADRANT BACKSCATTERED ELECTRON DETECTOR TYPE 400). Para análise de Energia Dispersiva (EDS) foi utilizado um equipamento EDX LINK ANALYTICAL (Isis System Series 200), com detector de SiLi Pentafet, janela ultrafina ATW II (Atmosphere Thin Window), de resolução de 133eV a 5,9keV e área de 10mm²

quadrado, acoplado a um microscópio eletrônico (ZEISS LEO 440, Cambridge, England). Utilizou-se padrão de Co para calibração, feixe de elétrons de 20 kV, distância focal de 25 mm, dead time de 30%, corrente de 2,82A e I probe de 950pA. A avaliação do percentual de Cálcio (% Ca) e proporção cálcio/fósforo (Ca/P) foi realizada em três pontos distintos, distribuídos em linha reta, na terceira rosca dos implantes, sendo representativos do tecido ósseo mais próximo ao implante (ponto 1), do tecido ósseo na porção mediana da rosca (ponto 2) e do osso nativo (ponto 3). Para padronização da localização dos pontos avaliados, foram definidas as distâncias a partir da superfície do implante (linha A)(Figura 7).

Figura 7 - Imagem representativa de amostra submetida à Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), ilustrando os pontos nos quais foram realizadas as análises por Espectroscopia de Energia Dispersiva de raios-X (EDS). Distâncias entre: linhas A – B: 30,0 μm ; linhas A – C: 145,0 μm ; linhas A – D: 1030,0 μm .



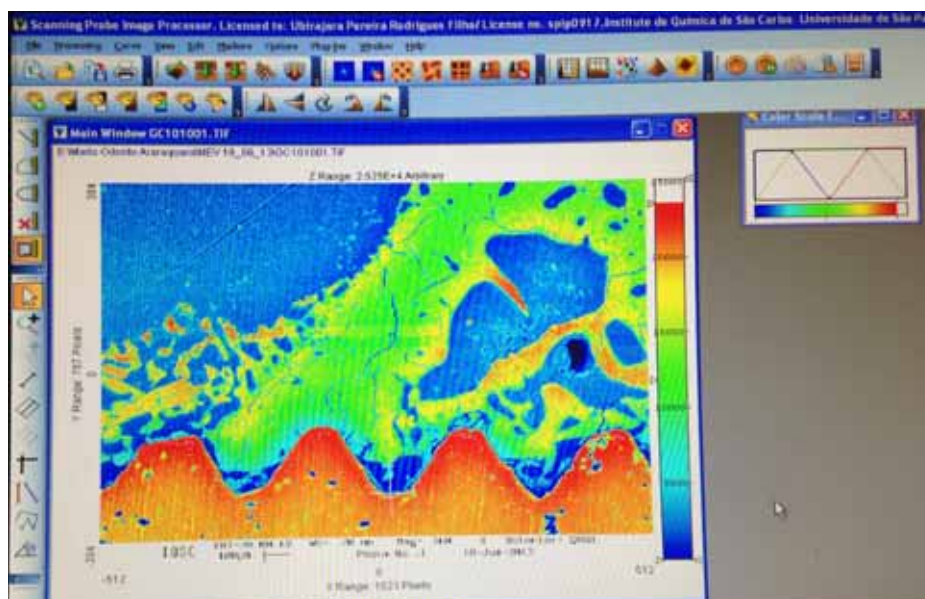
Mapeamento da Mineralização

Com base nas imagens adquiridas por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi realizado o mapeamento da mineralização óssea ao redor dos implantes e osso nativo, durante os diferentes períodos.

Para tanto foi empregado um software (Scanning Probe Image Processor, Hørsholm- Denmark) (Figura 8), o qual permite mapear, por meio de cores, o tecido ósseo e seus diferentes graus de mineralização. Na escala disponível no programa, as colorações próximas ao azul representam áreas com menor grau de mineralização, enquanto regiões com colorações próximas ao vermelho representam áreas com maior grau de mineralização.

Uma análise descritiva quanto à distribuição dos diferentes graus de mineralização, comparando-se os grupos em todos os períodos de observação, foi realizada buscando complementar as análises de conteúdo mineral.

Figura 8 - Imagem ilustrativa do software Scanning Probe Image Processor para mapeamento da mineralização.



Análise Estatística

Os dados desse estudo foram numéricos e devido a isso um teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi aplicado para avaliar a distribuição dos dados de acordo com o teorema da distribuição central. Em função da distribuição normal, testes paramétricos foram aplicados para a análise inferencial dos dados. Para avaliação intergrupos, em cada período de análise, foi empregado o teste t-não pareado. Já para avaliar a evolução temporal dentro de cada grupo (análise intragrupo) foi empregado o teste Anova seguido pelo pós-teste de Tukey.

O software GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA) foi utilizado para execução das análises estatísticas. Todos os testes foram aplicados com nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

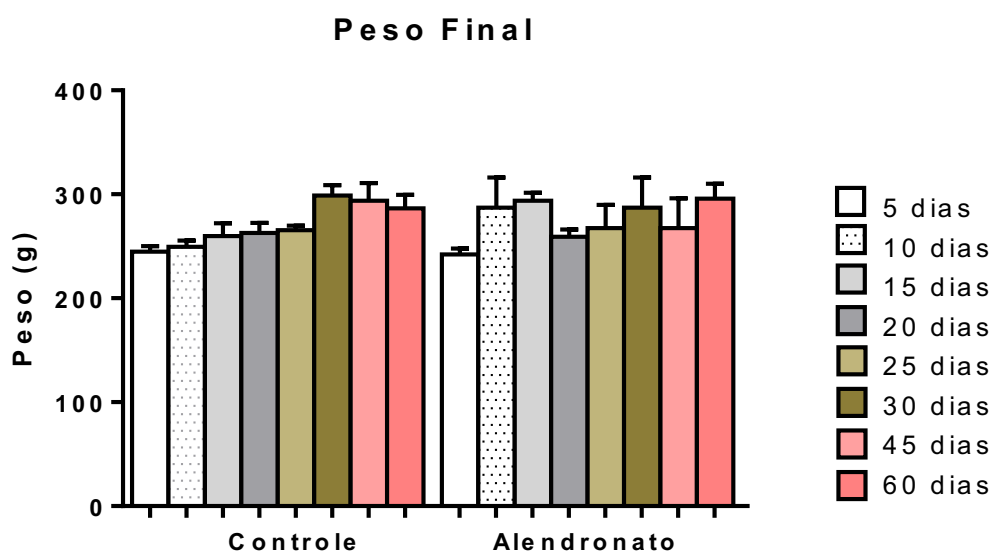
Resultado

RESULTADO

Peso dos animais

A utilização do alendronato na concentração de 1 mg/kg/semana não promoveu qualquer intercorrência durante o decorrer do estudo. A droga não influenciou de maneira significativa o peso dos animais, não havendo diferença entre grupos ao final do tratamento (Figura 9).

Figura 9 - Média e desvio padrão do peso dos animais no dia do sacrifício para ambos os grupos.



Densitometria Óssea

A análise dos dados referentes à densitometria óssea global e das sub-regiões do fêmur (R1-epífise proximal; R2-epífise distal; R3-diáfise), demonstrou valores de densidade mineral óssea significativamente superiores para o grupo alendronato quando comparado ao grupo controle, em cada período.

A análise da epífise proximal demonstrou que o grupo alendronato apresentou maiores valores de BMD nos períodos de 5, 30 e 45 dias ($p<0.01$) em relação ao grupo controle. Já na epífise distal, o grupo alendronato apresentou maiores valores de BMD nos períodos de 5($p<0.001$), 10($p<0.01$), 20($p<0.05$), 25($p<0.001$), 30($p<0.001$), 45($p<0.001$), e 60 dias($p<0.001$) em comparação ao grupo controle. Com relação à diáfise foram verificados, para o grupo alendronato, maiores valores de BMD nos períodos de 20($p<0.01$), 30($p<0.01$), 45($p<0.01$) e 60 dias($p<0.01$) em relação ao grupo controle. Na avaliação da BMD global foram constatados valores significativamente maiores para o grupo alendronato nos períodos de 5($p<0.001$), 10($p<0.05$), 20($p<0.001$), 25($p<0.05$), 30($p<0.001$), 45($p<0.001$), e 60 dias($p<0.001$) em relação ao grupo controle.

A análise intragrupo, levando-se portanto em consideração a evolução temporal, demonstrou que o grupo controle não apresentou alterações estatisticamente significantes na região de epífise proximal. Já para o grupo alendronato, houve um aumento estatisticamente significativo da BMD nos períodos de 30 ($p<0.001$), 45($p<0.01$) e 60 dias ($p<0.05$) em relação ao período de 15 dias. Quanto à epífise distal, foi verificado no grupo controle um aumento significativo da BMD no período de 30 dias em relação ao período de 5 dias ($p<0.05$), enquanto no grupo alendronato foram verificados maiores valores de BMD nos períodos de 10($p<0.05$), 30($p<0.001$),

45($p<0.01$) e 60 dias($p<0.001$) em relação ao período de 15 dias. Na diáfise foram verificados, no grupo controle, valores significativamente maiores de BMD no período de 5 dias em comparação aos demais períodos ($p<0.05$), enquanto para o grupo alendronato os períodos de 10 e 15 dias demonstraram os menores, embora com diferença significativa apenas quando comparados aos períodos de 5 ($p<0.05$) e 20 dias ($p<0.01$). A avaliação da BMD global demonstrou que o grupo controle não apresentou variações estatisticamente significantes ao longo do tempo. Por outro lado, o grupo alendronato apresentou valores significativamente menores no período de 15 dias, havendo posteriormente um aumento significativo. Os dados de média e desvio padrão da densidade mineral óssea (BMD) global e de sub-regiões do fêmur (epífise proximal, epífise distal e diáfise) estão expostos nas Tabelas 1 - 4.

Tabela 1 - Média e desvio padrão dos valores de densidade mineral óssea (BMD) na região da epífise proximal para grupos controle e alendronato, nos diferentes períodos de avaliação.

Grupo/Período	5 dias	10 dias	15 dias	20 dias	25 dias	30 dias	45 dias	60 dias
Controle	0.205±0.01 a	0.222±0.01a	0.223±0.01a	0.221±0.02a	0.225±0.02a	0.223±0.01 a	0.216±0.02a	0.223±0.01a
Alendronato	0.234±0.01 *b	0.229±0.00b	0.212±0.01c	0.232±0.01b	0.227±0.01b	0.249±0.02 *a	0.245±0.01 *a	0.238±0.01a

*p<0,01 – Diferença entre grupos (Teste t-não pareado).

Letras representam diferenças estatisticamente significantes entre períodos para cada grupo (Anova com teste post-hoc de Tukey).

Tabela 2 - Média e desvio padrão dos valores de densidade mineral óssea (BMD) na região da epífise distal para grupos controle e alendronato, nos diferentes períodos de avaliação.

Grupo/Período	5 dias	10 dias	15 dias	20 dias	25 dias	30 dias	45 dias	60 dias
Controle	0.188±0.01b	0.221±0.02a	0.216±0.03a	0.207±0.03a	0.192±0.02b	0.229±0.02a	0.226±0.03a	0.227±0.01a
Alendronato	0.252±0.04γb	0.264±0.03δa	0.210±0.03c	0.260±0.05*b	0.261±0.03γb	0.299±0.02γa	0.285±0.02γa	0.300±0.02γa

*p<0,05; δp<0,01; γp<0,001 Diferença entre grupos (Teste t-não pareado).

Letras representam diferenças estatisticamente significantes entre períodos para cada grupo (Anova com teste post-hoc de Tukey).

Tabela 3 - Média e desvio padrão dos valores de densidade mineral óssea (BMD) na região da diáfise para grupos controle e alendronato, nos diferentes períodos de avaliação.

Grupo/Período	5 dias	10 dias	15 dias	20 dias	25 dias	30 dias	45 dias	60 dias
Controle	0.233±0.01a	0.208±0.03b	0.204±0.01b	0.199±0.01b	0.203±0.01b	0.202±0.01b	0.195±0.01b	0.202±0.00b
Alendronato	0.238±0.04a	0.202±0.01c	0.198±0.01c	0.245±0.04*a	0.202±0.01c	0.226±0.01*b	0.215±0.00*b	0.220±0.01*b

*p<0,01 Diferença entre grupos (Teste t-não pareado).

Letras representam diferenças estatisticamente significantes entre períodos para cada grupo (Anova com teste post-hoc de Tukey).

Tabela 4 - Média e desvio padrão dos valores de densidade mineral óssea (BMD) Global para grupos controle e alendronato, nos diferentes períodos de avaliação.

Grupo/Período	5 dias	10 dias	15 dias	20 dias	25 dias	30 dias	45 dias	60 dias
Controle	0.203±0.01a	0.213±0.01a	0.215±0.02a	0.207±0.01a	0.207±0.01a	0.215±0.01a	0.209±0.01a	0.215±0.01a
Alendronato	0.236±0.018a	0.230±0.01*b	0.206±0.01c	0.238±0.018a	0.228±0.02*b	0.255±0.018a	0.245±0.018a	0.249±0.018a

*p<0,05; δp<0,001 Diferença entre grupos (Teste t-não pareado).

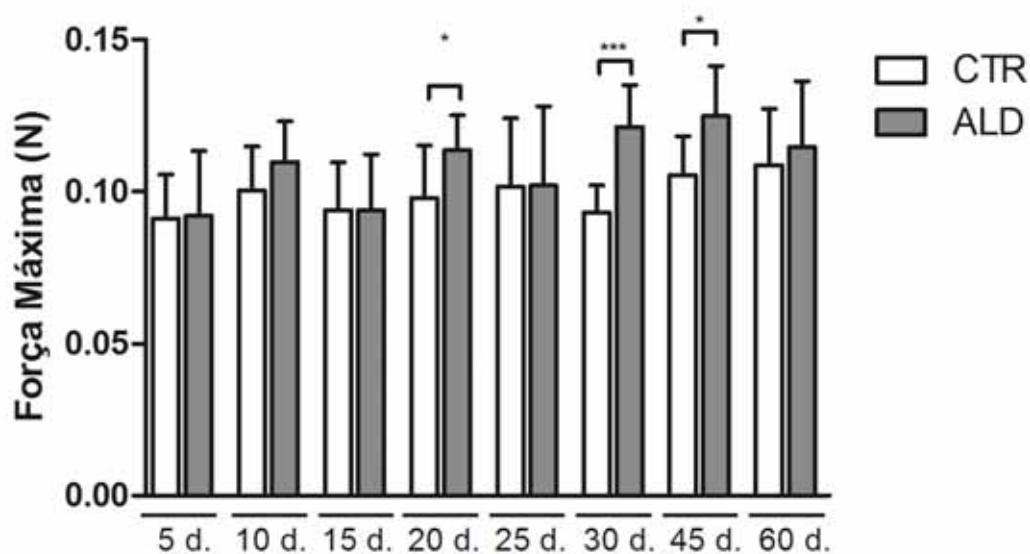
Letras representam diferenças estatisticamente significantes entre períodos para cada grupo (Anova com teste post-hoc de Tukey).

Ensaio Mecânico

Força Máxima

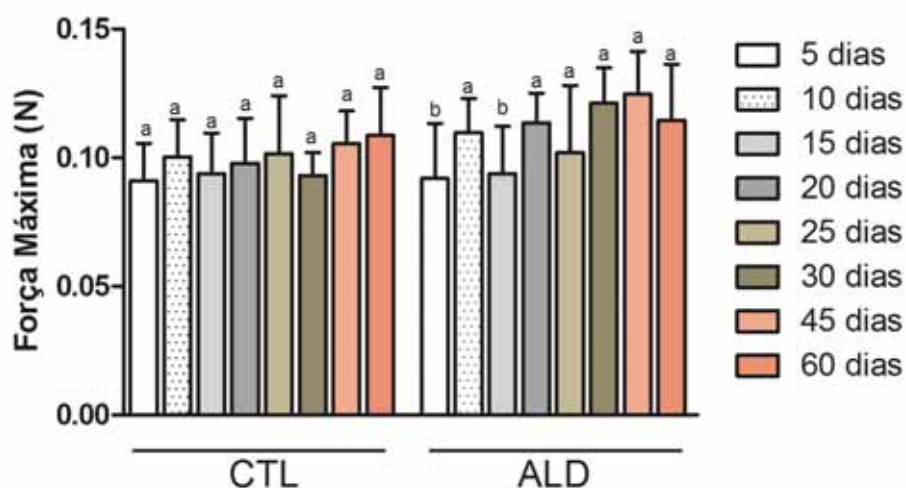
Foi verificado no teste de força máxima de fratura do fêmur que o alendronado apresentou maiores valores de força de fratura em relação ao grupo controle, nos períodos de 20 ($p<0.05$), 30($p<0.001$) e 45 dias($p<0.05$) (Figura 10).

Figura 10 - Comparação entre grupos quanto aos valores de força máxima de fratura do fêmur. Valores expressos em Média e desvio padrão. (* $p<0.05$;*** $p<0.001$ - Teste t-não pareado).



A análise intragrupos demonstrou que, para o grupo alendronado, os períodos de 30 e 45 dias apresentaram valores significativamente maiores em comparação aos períodos de 5 e 15 dias ($p<0.05$). No grupo controle não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre períodos (Figura 11).

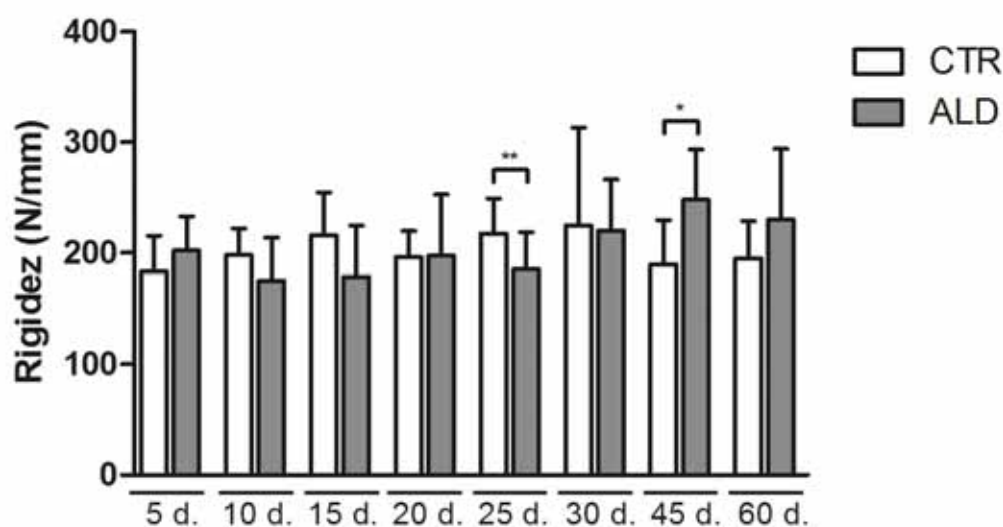
Figura 11 - Média e desvio padrão dos valores de força máxima de fratura do fêmur para grupos controle e alendronato, nos diferentes períodos de avaliação. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes entre períodos para cada grupo ($p < 0,05$; Anova com teste post-hoc de Tukey).



Rigidez

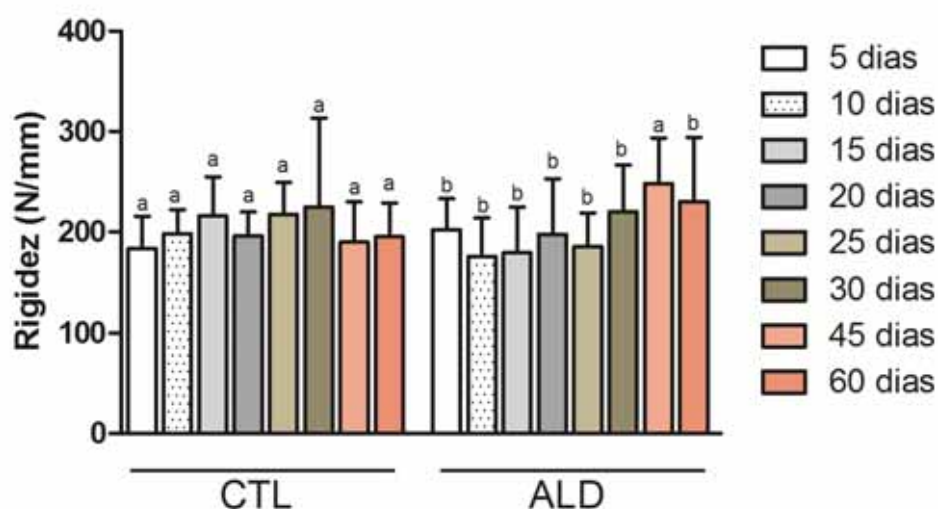
Com relação à análise de rigidez óssea, foram verificados maiores valores para o grupo controle no período de 25 dias em relação ao grupo alendronato ($p < 0,05$). Entretanto, aos 45 dias foi verificada uma inversão nos valores, com o grupo alendronato apresentando valores de rigidez óssea significativamente maiores em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 12).

Figura 12 - Comparação entre grupos quanto aos valores de rigidez óssea (N/mm) do fêmur. Valores expressos em Média e desvio padrão. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ - Teste t-não pareado).



Com relação à análise intragrupos, foi verificado para o grupo alendronato um aumento nos valores de rigidez no período de 45 dias em relação ao período de 10 dias (Figura 13).

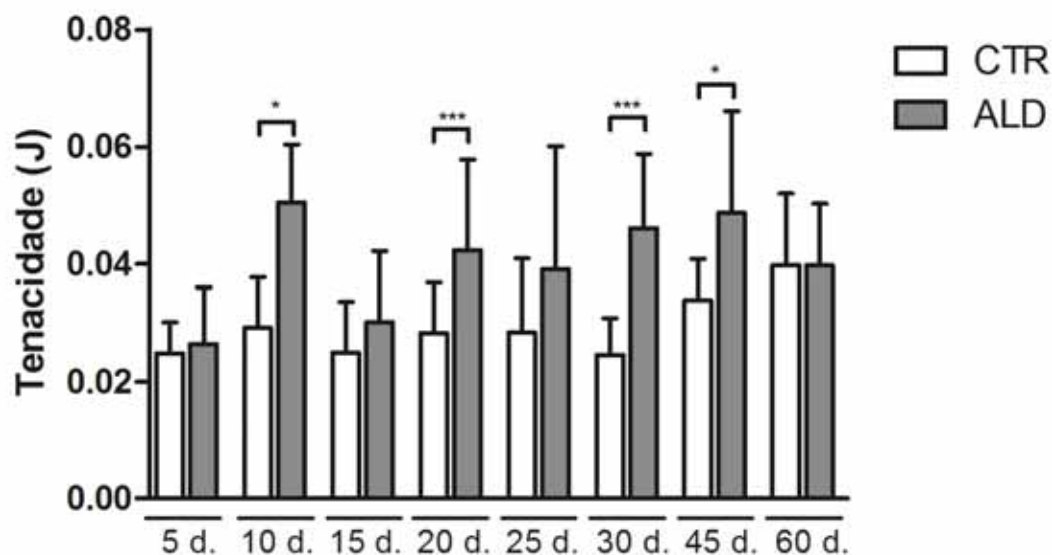
Figura 13 - Média e desvio padrão dos valores de rigidez óssea (N/mm) do fêmur para grupos controle e alendronato, nos diferentes períodos de avaliação. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes entre períodos para cada grupo ($p < 0,05$; Anova com teste post-hoc de Tukey).



Tenacidade

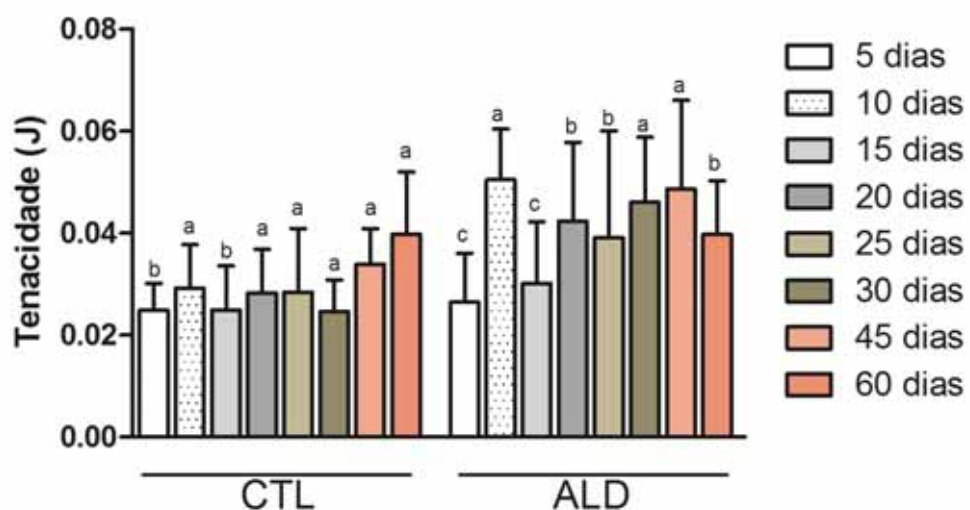
Com relação à tenacidade foi verificado, na análise intergrupos, que o grupo alendronato apresentou maiores valores em relação ao grupo controle nos períodos de 10 ($p < 0.001$), 20 ($p < 0.05$), 30 ($p < 0.001$) e 45 dias ($p < 0.05$) (Figura 14).

Figura 14 - Comparação entre grupos quanto aos valores de tenacidade (J) do fêmur. Valores expressos em Média e desvio padrão. (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ - Teste t-não pareado).



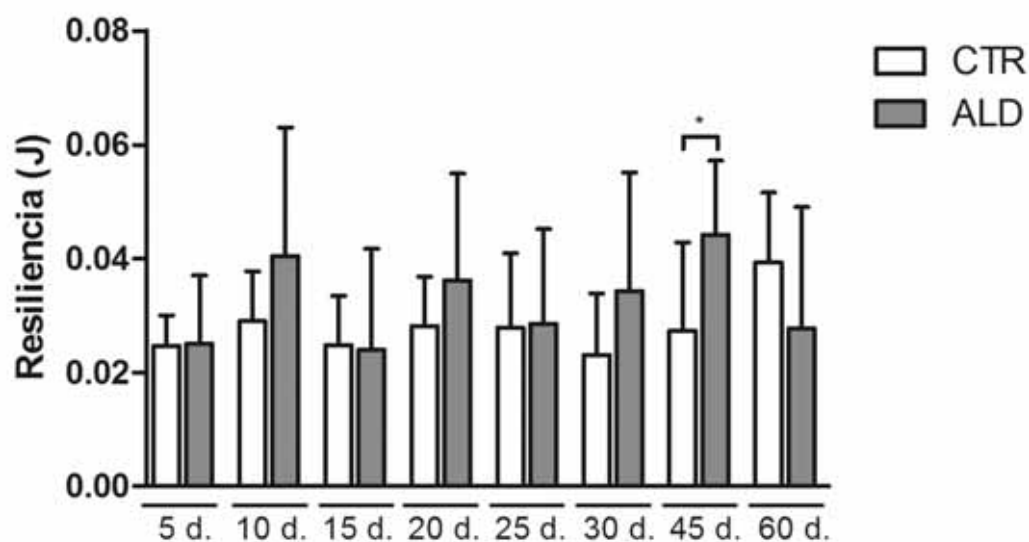
Quanto à análise intragrupos foi verificado que o grupo controle apresentou um aumento significativo no período de 60 dias em relação aos períodos de 5 e 15 dias ($p < 0.05$). Adicionalmente, no grupo alendronato foram verificados valores significativamente maiores de tenacidade óssea no período de 10 dias em relação aos períodos de 5 e 15 dias ($p < 0.05$), assim como nos períodos de 30 e 45 dias em relação ao período de 5 dias (Figura 15).

Figura 15 - Média e desvio padrão dos valores da tenacidade (J) do fêmur para grupos controle e alendronato, nos diferentes períodos de avaliação. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes entre períodos para cada grupo ($p<0,05$; Anova com teste post-hoc de Tukey).



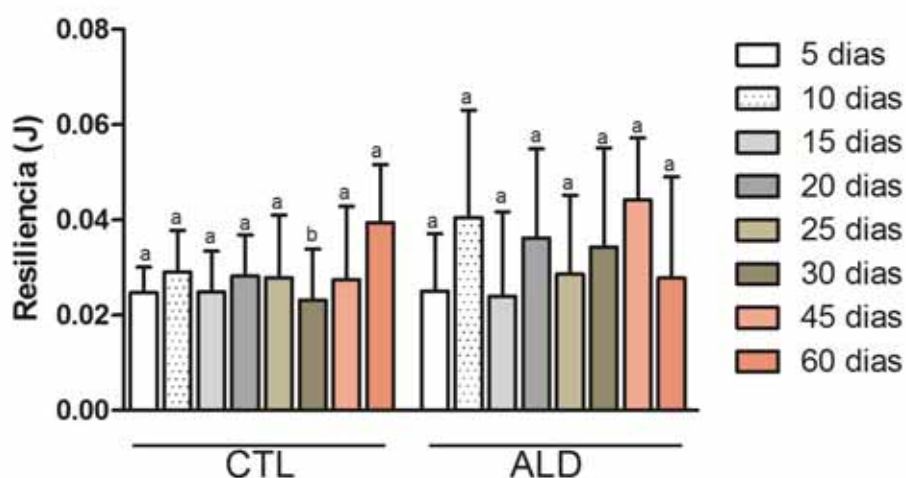
Quanto à resiliência óssea, na análise intergrupos foi verificado, aos 45 dias, valores estatisticamente superiores no grupo alendronato em relação ao grupo controle ($p<0.05$). Entretanto, ressalta-se a redução aos 60 dias para o grupo alendronato, enquanto houve um aumento para o grupo controle (Figura 16).

Figura 16 - Comparação entre grupos quanto aos valores de resiliência (J) do fêmur. Valores expressos em Média e desvio padrão. (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ - Teste t-não pareado).



A análise intragrupos demonstrou, para o grupo controle, um aumento de valores de resiliência óssea no período de 60 dias, sendo que os menores valores foram vistos aos 30 dias (Figura 17). Para o grupo alendronato não foram verificadas diferenças significantes entre os períodos.

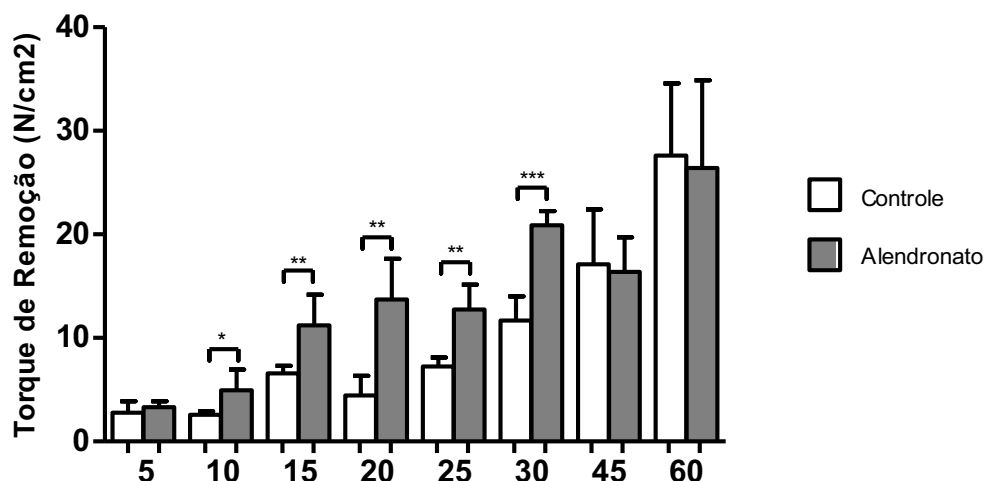
Figura 17 - Média e desvio padrão dos valores de resiliência (J) do fêmur para grupos controle e alendronato, nos diferentes períodos de avaliação. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes entre períodos para cada grupo ($p < 0,05$; Anova com teste post-hoc de Tukey).



Análise Biomecânica

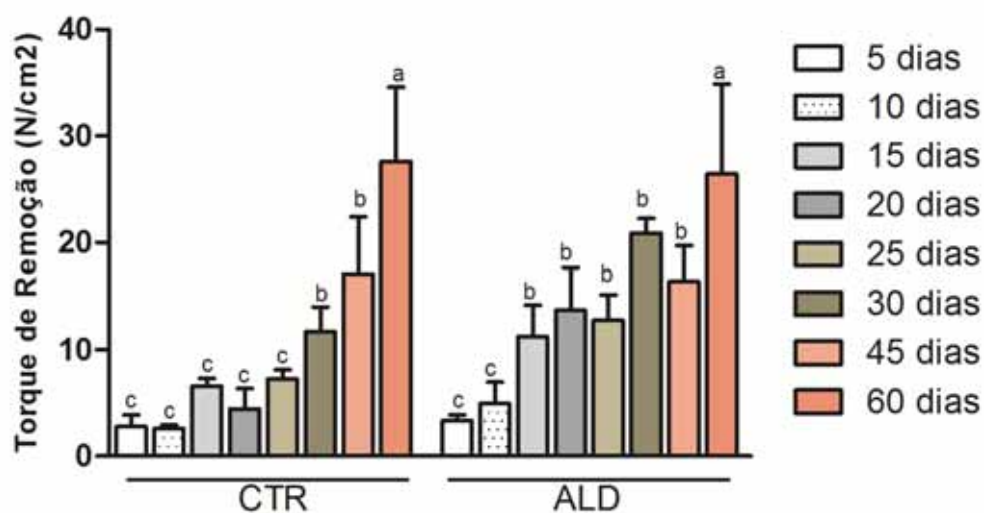
Na comparação intergrupos, dentro de cada período de avaliação, pode-se evidenciar que o grupo alendronato apresentou valores de torque de remoção dos implantes significativamente maiores em comparação ao grupo controle nos períodos de 10 ($p < 0,05$), 15 ($p < 0,01$), 20 ($p < 0,01$), 25 ($p < 0,01$) e 30 dias ($p < 0,001$) (Figura 18).

Figura 18 - Comparação entre grupos para valores de Torque de Remoção (N/cm^2). Valores expressos em Média e desvio padrão. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ - Teste t-não pareado).



A avaliação da influência do tempo após a instalação dos implantes sobre o torque de remoção, para os grupos controle e alendronato, está demonstrada na Figura 19. É possível verificar que para o grupo controle não houve diferença significativa até o período de 25 dias, havendo a partir desse período um aumento contínuo e significativo. Quanto ao grupo alendronato, pode-se verificar que houve um aumento contínuo dos valores de torque, com os primeiros períodos (5 e 10 dias) apresentando os menores valores, sendo estes estatisticamente diferentes dos demais. A partir de 15 dias até o período de 45 dias os valores aumentam, porém sem diferença estatisticamente significativa entre eles. Assim como no grupo controle, o período de 60 dias do grupo alendronato apresenta os maiores valores com diferença estatisticamente significativa em relação aos demais.

Figura 19 - Média e desvio padrão dos valores de Torque de Remoção (N/cm^2) para grupos controle e alendronato, nos diferentes períodos de avaliação. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes entre períodos para cada grupo ($p < 0,05$; Anova com teste post-hoc de Tukey).

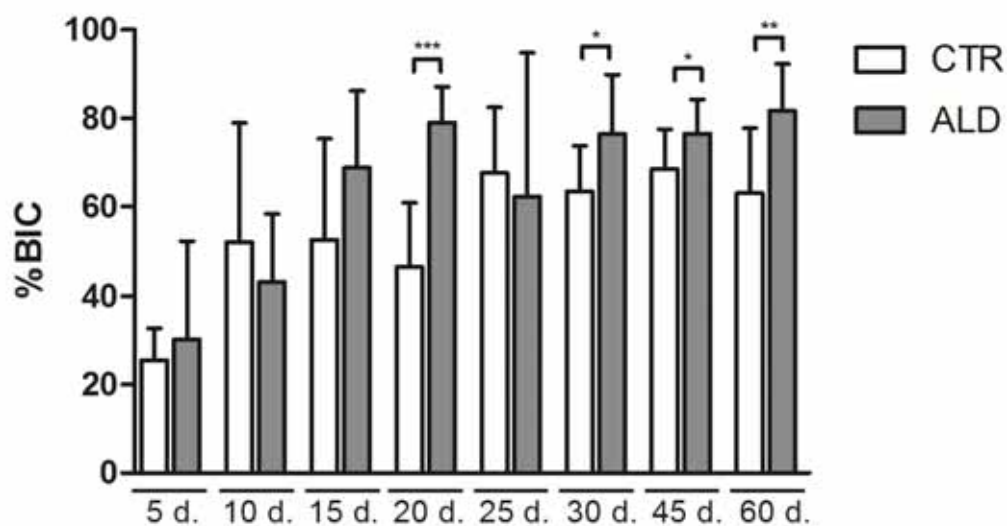


Análise Histométrica

Contato Osso/Implante (BIC)

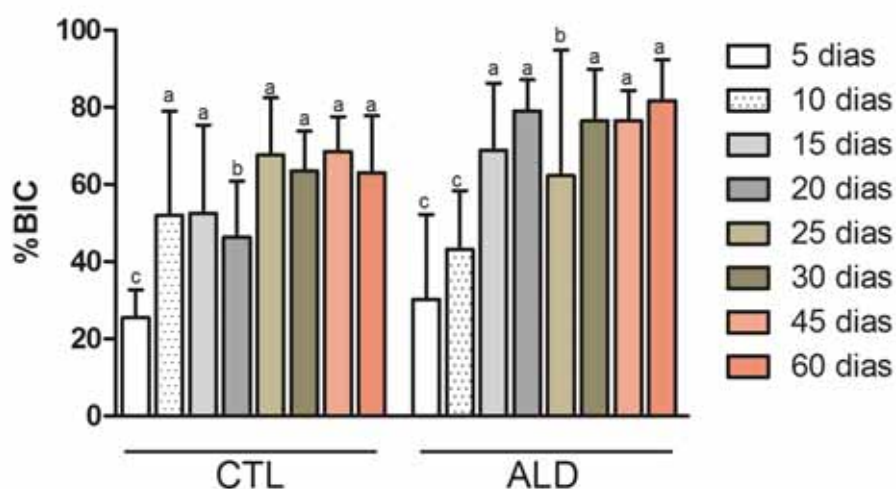
A análise intergrupos, quanto ao %BIC, demonstrou que o grupo alendronato apresentou valores estatisticamente superiores em relação ao grupo controle nos períodos de 20 ($p < 0.001$), 30 ($p < 0.05$), 45 ($p < 0.05$) e 60 dias ($p < 0.01$) (Figura 20).

Figura 20 - Comparação entre grupos quanto ao percentual de contato osso/implante (%BIC). Valores expressos em Média e desvio padrão. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ - Teste t-não pareado).



Na análise intragrupos pode-se constatar que o grupo controle apresentou um aumento do %BIC estatisticamente significativo em relação aos períodos de 5 e 20 dias ($p < 0.05$). Dentro do grupo alendronato foi verificado um aumento do %BIC em relação aos períodos de 5, 10 e 25 dias ($p < 0.05$) (Figura 21).

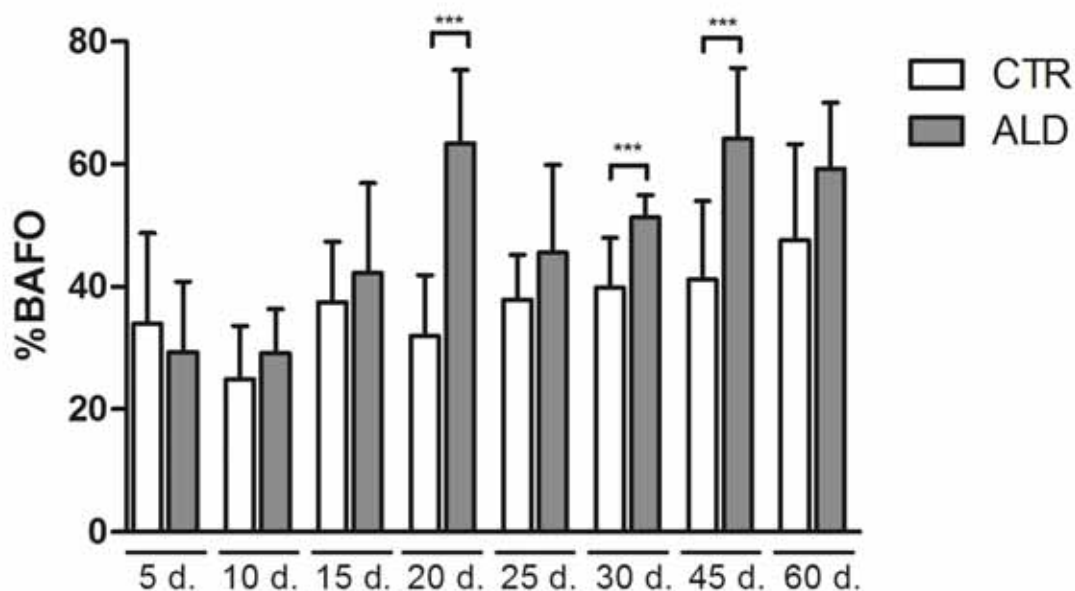
Figura 21 - Média e desvio padrão do percentual de contato osso/implante (%BIC) para grupos controle e alendronato, nos diferentes períodos de avaliação. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes entre períodos para cada grupo ($p < 0,05$; Anova com post-hoc teste de Tukey).



Área entre as roscas ocupada por tecido ósseo (BAFO)

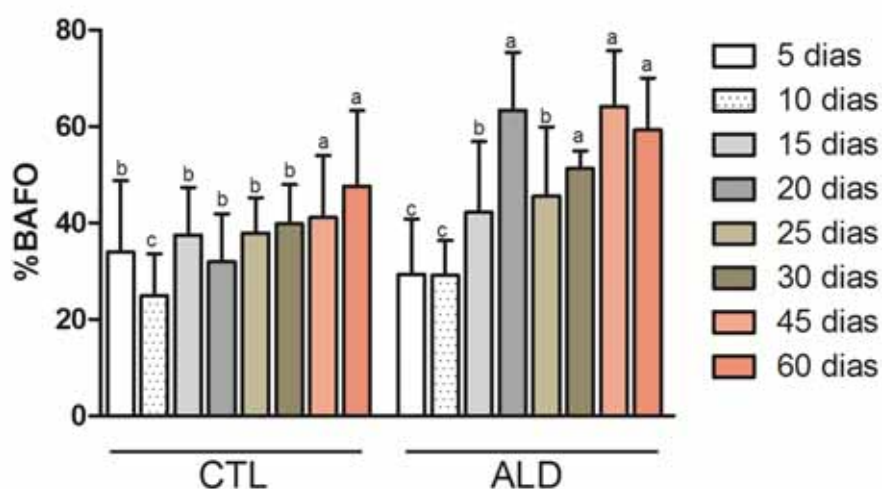
A análise intergrupos demonstrou que o grupo alendronato apresentou maior %BAFO em relação ao grupo controle nos períodos de 20, 30 e 45 dias ($p < 0.001$) (Figura 22).

Figura 22 - Comparação entre grupos quanto ao percentual de área entre as roscas do implante ocupada por tecido ósseo (%BAFO). Valores expressos em Média e desvio padrão. (***) $p < 0.001$ - Teste t-não pareado).



Por outro lado, a análise intragrupos evidenciou para o grupo controle um aumento estatisticamente significativo do %BAFO nos períodos de 45 e 60 dias em relação aos demais períodos ($p < 0.05$), enquanto que no grupo alendronato foi verificado um aumento no %BAFO nos períodos de 20, 30, 45 e 60 dias em relação aos demais períodos ($p < 0.05$) (Figura 23).

Figura 23 - Média e desvio padrão do percentual de área entre as roscas do implante ocupada por tecido ósseo (%BAFO) para grupos controle e alendronato, nos diferentes períodos de avaliação. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes entre períodos para cada grupo ($p < 0,05$; Anova com teste post-hoc de Tukey).



Análise do arranjo e distribuição do colágeno

Os cortes relativos aos implantes instalados nas tíbias, corados com picrosirius e analisadas ao microscópio com luz polarizada, mostraram acentuada birrefringência do tecido ósseo. A análise das áreas situadas na terceira rosca dos implantes revelou diferenças quanto ao arranjo do colágeno birrefringente entre os grupos (CTL e ALD), no decorrer dos períodos experimentais.

Grupo Controle

Aos 5, 10 e 15 dias, trabéculas ósseas irregulares, exibindo feixes de fibras colágenas espessos com acentuada birrefringência, foram freqüentemente observadas nas áreas próximas aos implantes do grupo CTL; as trabéculas ósseas interconectas delimitavam amplos espaços. As trabéculas ósseas exibiram feixes de colágeno dispostos em camadas paralelas ou circunferências; algumas trabéculas ósseas contendo fibras colágenas birrefringentes dispostas irregularmente situavam-se entre o osso lamelar (Figura 24 a - c). Aos 20 dias, as trabéculas de osso lamelar estendiam-se, na maioria das vezes, por toda a área da rosca do implante. Além disso, a partir deste período uma fina camada de feixes de fibras colágenas birrefringentes, foi observada em íntimo contato com a superfície dos implantes, em 57% das roscas analisadas (Figura 24 d). Aos 25 dias, a presença desta camada birrefringente justaposta aos implantes foi observada em 70% das áreas avaliadas (Figura 25 a). Nos períodos subsequentes, 100% das áreas apresentaram a camada de lamelas paralelas de colágeno birrefringente; muitas destas lamelas estavam em continuidade às lamelas concêntricas de colágeno que preenchiam a porção central das roscas dos implantes. Nos períodos de 45 e 60 dias, lamelas de colágeno com arranjo concêntrico, de aspecto similar ao do sistema de Havers, dispunham-se entre as trabéculas ósseas contendo lamelas de colágeno dispostos paralelamente (Figura 25 b - d).

Grupo alendronato

Nos períodos iniciais (5, 10 e 15 dias), as trabéculas ósseas finas e pequenas exibindo colágeno birrefringente formavam uma trama com arranjo irregular.

Frequentemente, delgados feixes de fibras colágenas birrefringentes estavam situados entre as trabéculas ósseas irregulares (Figuras 24 e - g). Aos 20 dias, feixes de colágeno birrefringentes com orientação irregular estavam distribuídos por toda área da rosca; ocasionalmente, uma camada birrefringente justaposta à superfície do implante foi observada (Figura 24 h). No período de 25 dias, esta camada birrefringente justaposta à superfície dos implantes, foi observada em 50% das áreas, enquanto que aos 30 dias foi de aproximadamente 80% das áreas analisadas. Neste grupo, esta camada apresentou-se extremamente fina e descontínua. Nos períodos de 30, 45 e 60 dias, as trabéculas ósseas apresentaram colágeno birrefringente com arranjo irregular e, freqüentemente, os feixes de colágeno apresentaram-se delgados, exibindo, conseqüentemente, pouca birrefringência (Figuras 25 e - h). Escassas trabéculas exibindo lamelas concêntricas (semelhante ao sistema de Havers) ou paralelas foram observadas (Figuras 24 e- h e 25 e - h).

Figura 24 - Fotomicrografias de secções dos implantes instalados nas tíbias dos grupos CTL (a, c, e, g) e ALD (b, d, f, g), coradas com picrossírius e analisadas ao microscópio de luz com filtros de polarização. A área das roscas dos implantes nos animais do grupo CTL exibem colágeno organizado em lamelas concêntricas (C) e lamelas paralelas (L), constituindo as trabéculas ósseas. Nota-se que nos animais do grupo ALD, os feixes de colágeno (FC) birrefringentes apresentam-se dispostos irregularmente. Uma camada descontínua de colágeno birrefringente (setas), justaposta à superfície dos implantes, é vista principalmente a partir de 20 dias. Aumento: 215x.

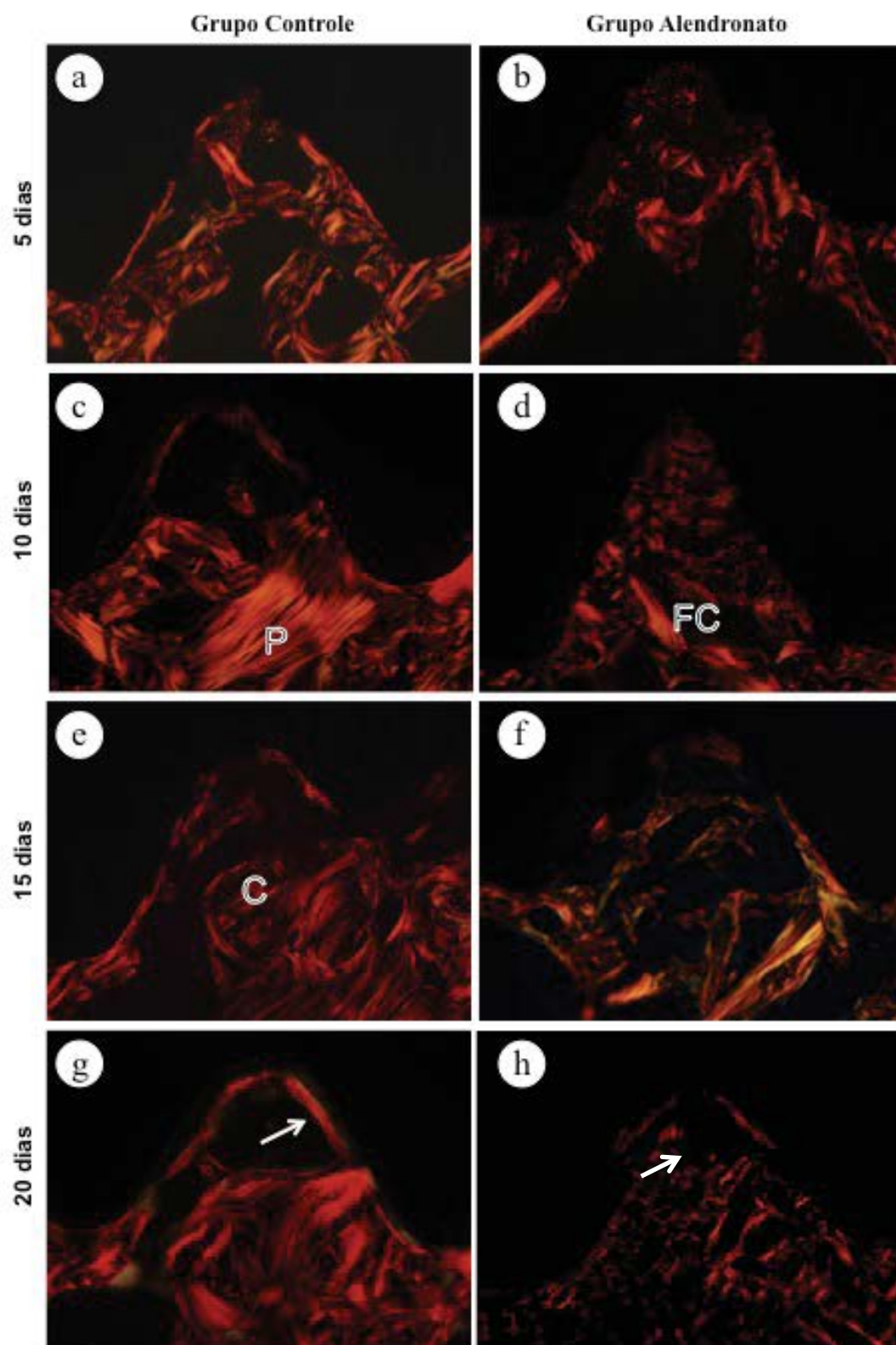
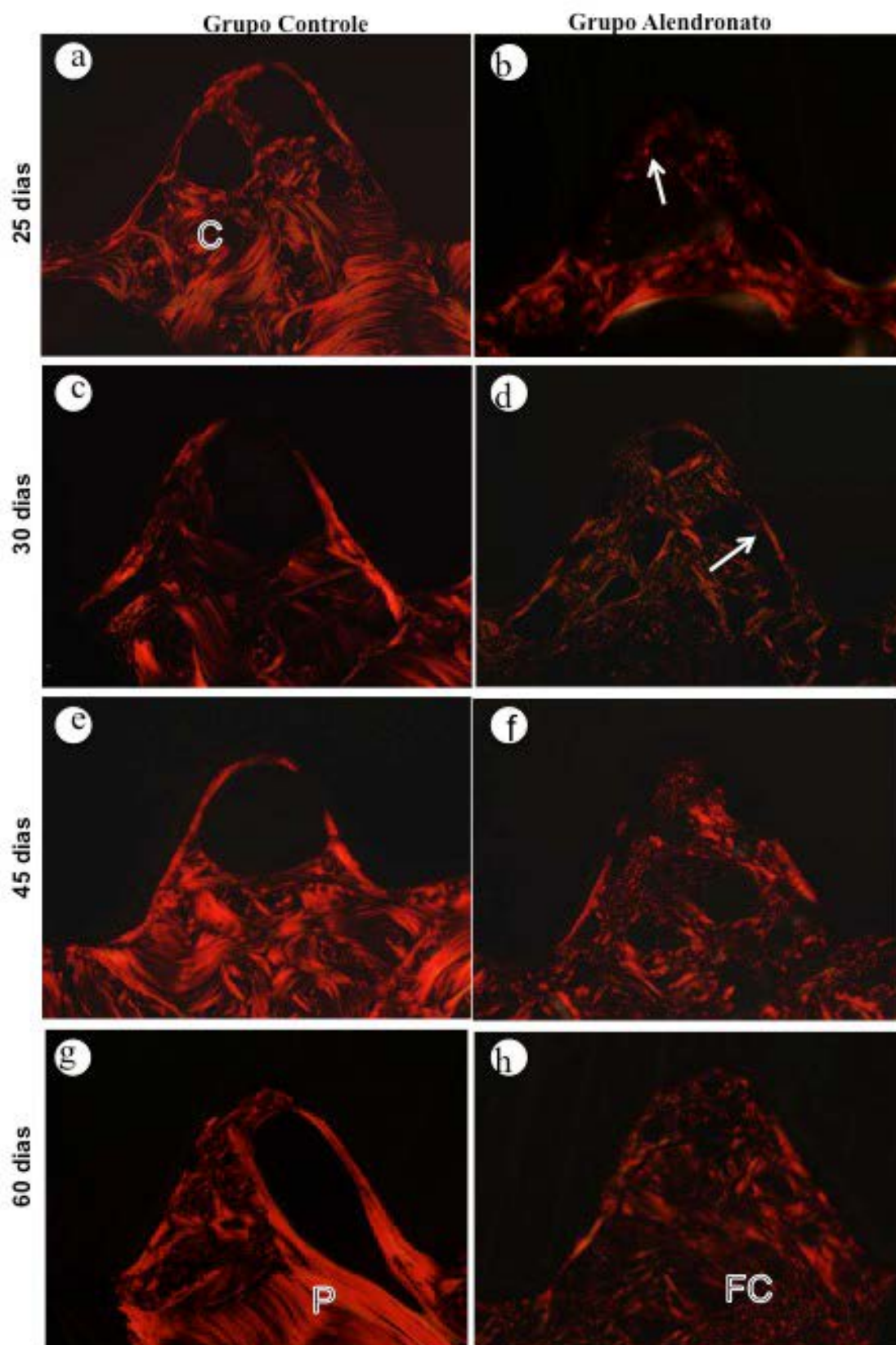


Figura 25 - Fotomicrografias de secções dos implantes instalados nas tíbias dos grupos CTL (a, c, e, g) e ALD (b, d, f, g), coradas com picro-sírius e analisadas ao microscópio de luz com filtros de polarização. No grupo CTL, os feixes de colágeno apresentam-se organizados em lamelas concêntricas (C) e paralelas (L) constituindo as trabéculas ósseas que se estendem por toda a área das roscas dos implantes; a presença de uma camada de colágeno birrefringente justaposta à superfície dos implantes é evidente no grupo CTL. Nota-se que no grupo ALD, os feixes de colágeno (FC) birrefringentes com arranjo irregular estão frouxamente distribuídos; a birrefringência é evidentemente menor no grupo ALD em comparação ao grupo CTL. A camada descontínua de colágeno birrefringente (setas) justaposta à superfície dos implantes está evidente no grupo CTL; no grupo ALD esta camada (setas) apresenta-se delgada. Aumento: 215x.



Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva de raios-X - (MEV / EDS)

Percentual de Cálcio (% Ca)

Na comparação intergrupos, dentro de cada período, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes, nos 3 pontos avaliados.

Já na comparação entre períodos dentro de cada grupo, os resultados demonstram, para o ponto 1, a ausência de diferença estatisticamente significativa, com aumento a partir de 10 dias e manutenção dos valores alcançados. Para os demais pontos, os resultados são semelhantes ao ponto 1, mantendo a ausência de diferença estatisticamente significativa entre períodos para ambos os grupos (Tabelas 5 - 7).

Tabela 5- Média e desvio padrão do percentual de Cálcio (% Ca) no ponto 1 para ambos os grupos, nos diferentes períodos de avaliação.

Grupo/Período	5 dias	10 dias	15 dias	20 dias	25 dias	30 dias	45 dias	60 dias
Controle	34.50±3.87	54.75±16.93	37.75±2.06	37.50±3.69	36.00±1.82	43.75±7.04	36.50±2.64	43.50±10.59
Alendronato	19.25±17.83	29.50±15.88	35.75±3.59	36.50±7.54	35.50±3.69	37.25±1.25	35.50±3.87	39.00±2.44

Tabela 6 - Média e desvio padrão do percentual de Cálcio (% Ca) no ponto 2 para ambos os grupos, nos diferentes períodos de avaliação.

Grupo/Período	5 dias	10 dias	15 dias	20 dias	25 dias	30 dias	45 dias	60 dias
Controle	36.00±0.81	35.75±2.50	40.00±2.58	47.50±15.69	39.75±5.18	39.00±2.16	37.00±1.82	37.75±2.87
Alendronato	35.50±16.54	18.75±17.53	36.25±3.86	37.25±2.06	38.25±1.89	37.50±1.29	39.25±2.50	35.75±1.70

Tabela 7 - Média e desvio padrão do percentual de Cálcio (% Ca) no ponto 3 para ambos os grupos, nos diferentes períodos de avaliação.

Grupo/Período	5 dias	10 dias	15 dias	20 dias	25 dias	30 dias	45 dias	60 dias
Controle	36.25±1.89	38.00±2.16	42.75±4.99	39.00±0.81	39.75±2.63	39.50±3.31	39.00±2.16	39.00±2.82
Alendronato	39.75±2.36	41.00±3.16	39.75±2.50	36.25±2.87	36.50±1.29	38.75±2.21	38.75±1.70	39.00±2.70

Proporção Cálcio/Fósforo (Ca/P)

A análise intergrupos demonstrou que, para o ponto 1, o grupo controle apresentou proporção Cálcio/Fósforo (Ca/P) significativamente maior em relação ao grupo alendronato, no período de 10 dias. Para os demais pontos não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Já na análise intragrupos, os resultados demonstram a ausência de diferença estatisticamente significativa entre períodos, para grupo alendronato, nos três pontos avaliados. Para grupo controle foi constatada diferença estatisticamente significativa entre o período de 10 dias e demais períodos (Tabelas 8 - 10).

Tabela 8 - Média e desvio padrão da proporção Ca/P no ponto 1 para ambos os grupos, nos diferentes períodos de avaliação.

Grupo/Período	5 dias	10 dias	15 dias	20 dias	25 dias	30 dias	45 dias	60 dias
Controle	2.05±0.08 ^b	5.01±2.63 ^a	2.22±0.02 ^b	2.18±0.21 ^b	2.14±0.07 ^b	2.29±0.11 ^b	2.14±0.07 ^b	2.71±1.00 ^b
Alendronato	1.35±0.96 ^a	1.78±0.84* ^a	2.16±0.09 ^a	2.40±0.71 ^a	2.25±0.15 ^a	2.25±0.09 ^a	2.86±1.34 ^a	2.25±0.09 ^a

*p<0,05 Diferença entre grupos (Teste t-não pareado).

Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes entre períodos para cada grupo (Anova e post-hoc teste de Tukey).

Tabela 9 - Média e desvio padrão da proporção Ca/P no ponto 2 para ambos os grupos, nos diferentes períodos de avaliação.

Grupo/Período	5 dias	10 dias	15 dias	20 dias	25 dias	30 dias	45 dias	60 dias
Controle	2.11±0.00	2.09±0.05	2.28±0.08	2.60±0.89	2.43±0.47	2.22±0.04	2.17±0.10	2.22±0.11

Tabela 10 - Média e desvio padrão da proporção Ca/P no ponto 3 para ambos os grupos, nos diferentes períodos de avaliação.

Grupo/Período	5 dias	10 dias	15 dias	20 dias	25 dias	30 dias	45 dias	60 dias
Controle	2.08±0.23	2.38±0.24	2.33±0.12	2.29±0.04	2.27±0.10	2.19±0.09	2.19±0.06	2.26±0.06
Alendronato	2.33±0.13	2.34±0.10	2.30±0.09	2.26±0.10	2.21±0.11	2.27±0.05	2.24±0.05	2.26±0.07

Mapeamento da mineralização

A análise descritiva quanto ao mapeamento da mineralização demonstra que no período de 5 dias, o grupo controle apresentou pequena quantidade de tecido ósseo entre as roscas. Já na região de osso remanescente observa-se o predomínio da cor verde claro característica de tecido ósseo maduro, com grau de mineralização intermediário de acordo com a escala de cor adjacente (Figura 26 a). Para o grupo alendronato, aos 5 dias (Figura 26 b) observa-se também pequena quantidade de tecido ósseo entre as roscas. Entretanto, o osso remanescente apresenta predomínio da coloração verde escuro, representando maior grau de mineralização em relação ao grupo controle no mesmo período.

No período de 10 dias, observa-se para o grupo controle (Figura 26 c) um aumento do tecido ósseo entre as roscas, embora sem preenchimento total dessas regiões; o osso remanescente apresenta predomínio da cor verde escuro. O grupo alendronato, nesse mesmo período (Figura 26 d), apresenta também aumento do tecido ósseo entre as roscas, embora sem total preenchimento das mesmas. O tecido ósseo remanescente apresenta predomínio da cor verde escuro.

Com relação ao grupo controle, no período de 15 dias (Figura 26 e), é observado tecido ósseo entre as roscas com predomínio da cor azul escuro, característico de tecido ósseo pouco mineralizado, sendo também notado espaços vazios. O tecido ósseo remanescente apresenta predomínio da cor verde claro. Para o grupo alendronato, no mesmo período (Figura 26 f), observa-se maior preenchimento dos espaços entre as roscas, com tecido ósseo em que predomina a cor verde claro. Para o tecido ósseo remanescente pode-se verificar o predomínio da cor verde escuro.

Aos 20 dias, observa-se para o grupo controle (Figura 27 g), tecido ósseo entre as roscas com predomínio da cor azul escuro, característica de tecido pouco mineralizado. Para o tecido ósseo remanescente observa-se predomínio da cor verde escuro. O grupo alendronato, aos 20 dias (Figura 26 h), apresenta maior quantidade de tecido ósseo entre as roscas, observando-se as cores azul escuro e verde claro, que caracterizam respectivamente tecido ósseo novo ainda pouco mineralizado e tecido ósseo com grau de mineralização mais avançado. O tecido ósseo remanescente apresenta predomínio da cor verde escuro.

A imagem representativa do grupo controle no período de 25 dias (Figura 27 a), revela maior preenchimento de tecido ósseo entre as roscas, com presença de dois diferentes níveis de mineralização, representados pelas cores azul escuro e verde claro. Na região ocupada por tecido ósseo remanescente são observadas as cores azul e verde escuro. Já para o grupo alendronato aos 25 dias (Figura 27 b), observa-se espaços entre as roscas preenchidos por tecido ósseo com predomínio da cor verde claro, havendo entretanto áreas sem preenchimento. Ambas as regiões, área entre as roscas e osso remanescente, apresentam predomínio da cor azul clara.

No período de 30 dias, para o grupo controle (Figura 27 c), o tecido ósseo entre as roscas apresenta níveis de mineralização diferentes, representados pelas cores azul escuro e verde claro, representando maior preenchimento entre roscas com tecido menos mineralizado. O tecido ósseo remanescente apresenta predomínio das cores verde claro e verde escuro. O grupo alendronato, no mesmo período (Figura 27 d), apresenta praticamente todo espaço entre as roscas preenchido por tecido ósseo, representado pela cor verde claro, o mesmo observado na região ocupada por tecido ósseo remanescente.

Aos 45 dias, para o grupo controle (Figura 27 e), é observado tecido ósseo entre as roscas também com diferentes níveis de mineralização, representados pelas cores verde claro e azul escuro, com predomínio de verde claro. Na região ocupada por tecido ósseo remanescente observa-se o predomínio das cores azul escuro e verde escuro. Para o grupo alendronato no mesmo período (Figura 27 f), observa-se tecido ósseo entre as roscas, com predomínio da cor azul escuro, representando osso menos mineralizado. O osso remanescente é, na maior parte, representado pela cor verde escuro.

Na avaliação da imagem representativa do grupo controle aos 60 dias (Figura 27 g), observa-se osso entre as roscas nas cores verde claro e azul escuro, embora existam espaços sem preenchimento ósseo. O tecido ósseo remanescente apresenta níveis de mineralização diferentes, representados pelas cores azul escuro e verde escuro. Para o grupo alendronato, aos 60 dias (Figura 27 h), observa-se na área entre as roscas, padrão semelhante ao controle quanto ao grau de mineralização, embora algumas áreas tenham maior preenchimento. Na região ocupada por tecido ósseo remanescente observa-se predomínio da cor verde escuro.

Figura 26 - Mapeamento da mineralização nos períodos de 5, 10, 15 e 20 dias.

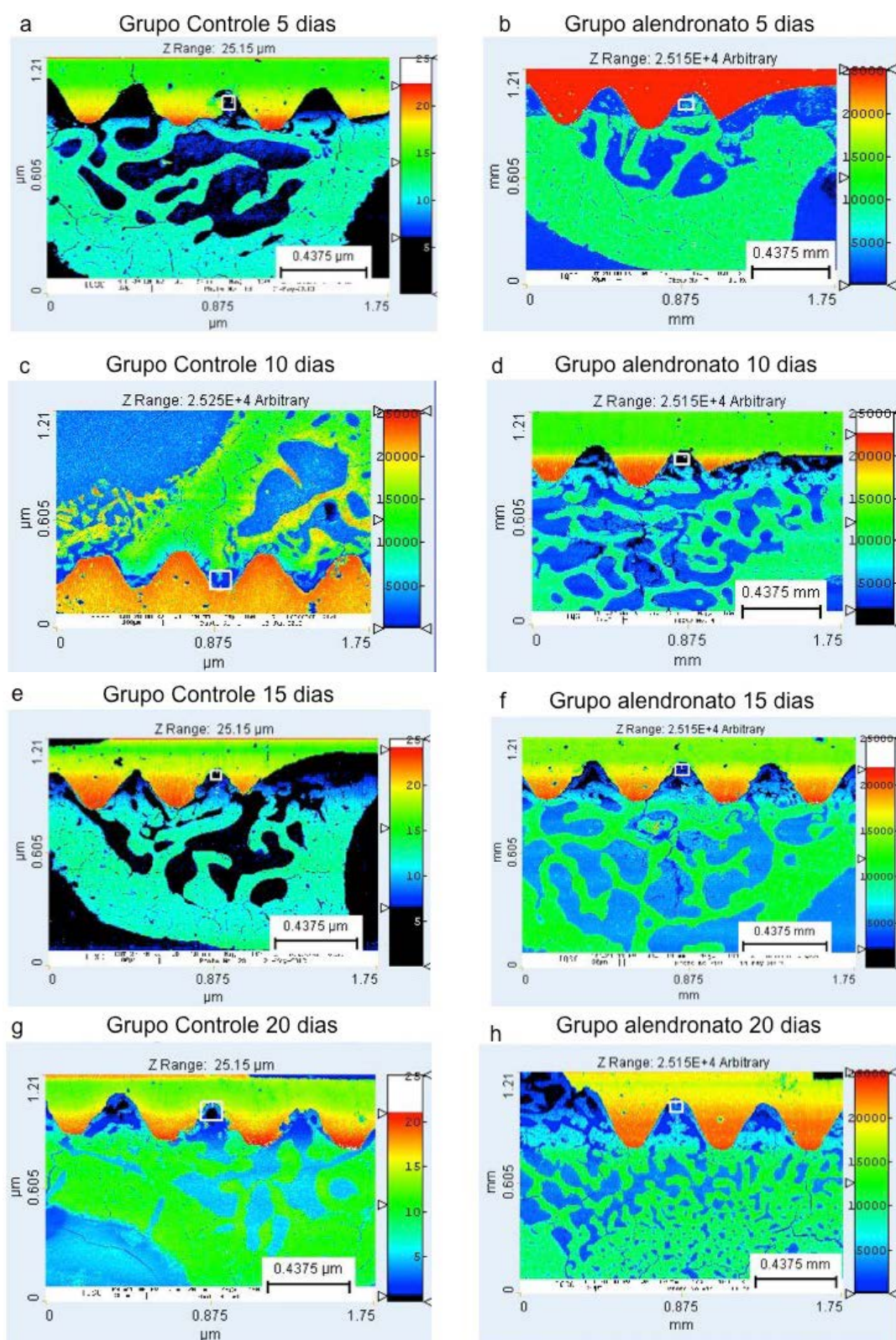
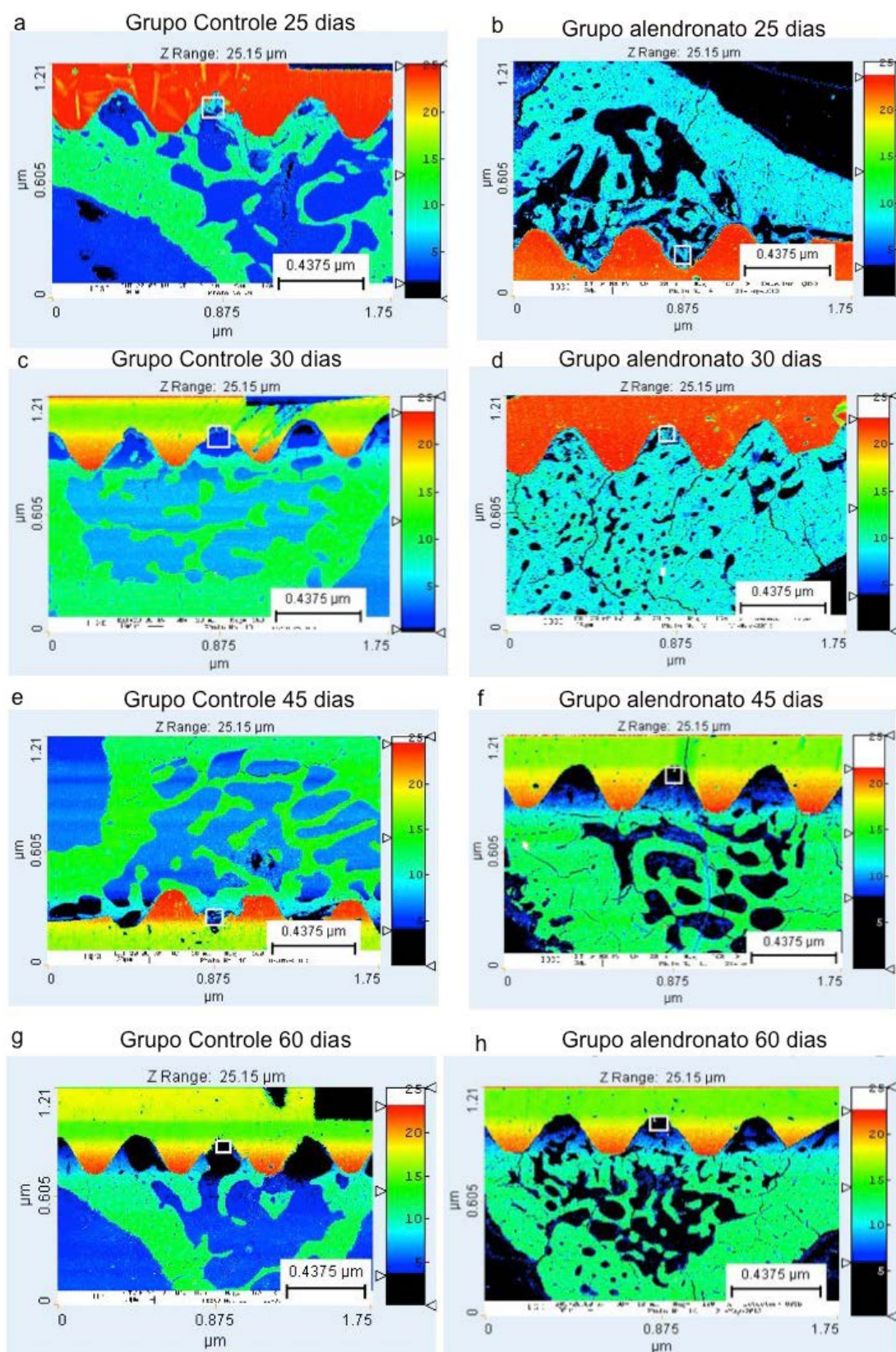


Figura 27 - Mapeamento da mineralização nos períodos de 25, 30, 45 e 60 dias.



Discussão

DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito, da administração a longo prazo, do alendronato sobre as características biomecânicas, o processo de reparo e a mineralização do tecido ósseo ao redor de implantes instalados em tíbia de ratas. Foi também analisado, sistemicamente, o impacto da droga sobre a densidade mineral e as propriedades mecânicas do tecido ósseo.

A escolha do alendronato nesse estudo foi em virtude do amplo uso dessa medicação no tratamento da osteopenia e osteoporose, tanto em homens quanto em mulheres (Iglesias et al.⁴⁶, 2013; Schwarz et al.¹⁰⁶, 2014). O período de 4 meses de uso da droga foi proposto para que houvesse a possibilidade de correlacionar a administração em animais ao uso, a longo prazo, em humanos. De acordo com Quinn⁹¹ (2005), 10,5 dias de vida para ratas é o equivalente a aproximadamente 1 ano para um humano adulto. Dessa forma, a administração por 4 meses, realizada nesse estudo, pode ser considerada o equivalente a 11,4 anos em humanos adultos.

Os resultados da análise de BMD demonstraram maiores valores para os animais do grupo ALD em relação ao grupo CTL em todos os períodos de avaliação, com exceção do período de 15 dias. Tais achados corroboram com outros estudos (Ayan et al.⁷, 2012; Yıldız et al.¹²⁴, 2010; Iwamoto et al.⁴⁸, 2013) que avaliaram o efeito dos bifosfonatos, tanto em dose única quanto a longo prazo, sobre a densidade do tecido ósseo. Também demonstra a estabilidade dos resultados alcançados com a droga, confirmando outros achados quanto à manutenção da densidade com o uso a longo prazo (Allen, Burr⁴, 2011; Odvina et al.⁸⁰, 2005). Clinicamente observou-se que as tíbias dos

animais do grupo ALD apresentaram maior resistência à fresagem e menor grau de sangramento, quando comparadas às tíbias dos animais do grupo CTL.

Com relação à análise das propriedades mecânicas foi verificado, para força máxima e tenacidade, a superioridade do grupo ALD em relação ao CTL nos períodos de 20 a 45 dias. Já com relação à rigidez, foram constatados valores superiores para o grupo CTL em relação ao grupo ALD no período de 25 dias; entretanto, aos 45 dias houve uma inversão, com o grupo ALD apresentando maior rigidez em relação ao CTL. A resiliência apresentou maiores valores para o grupo ALD, com diferença estatisticamente significativa, somente aos 45 dias. Entretanto, aos 60 dias observou-se uma tendência para maiores valores no grupo CTL em relação ao grupo ALD.

Os dados relativos às propriedades mecânicas em conjunto demonstraram maior resistência à fratura (força máxima) e maior capacidade de absorção de energia (tenacidade) no grupo ALD em relação ao grupo CTL até o período de 45 dias. No entanto, com relação ao potencial de deformação elástica (rigidez) do tecido ósseo submetido a cargas, foi constatado que aos 45 dias o grupo ALD apresentou valores significativamente maiores, o que poderia comprometer a resistência do tecido. Deve-se, entretanto, chamar a atenção para a ausência de diferença entre os grupos, quanto aos parâmetros mecânicos, aos 60 dias. Particularmente para parâmetros tenacidade e resiliência, houve uma queda de valores no grupo ALD do período de 45 para 60 dias, sendo essa queda significativa para a tenacidade. Já para o grupo CTL houve tendência de alta para valores de resiliência, o que levou à aparente igualdade dos grupos para os parâmetros citados. Tais achados colocam em dúvida os reais benefícios do alendronato sobre as propriedades mecânicas a longo prazo.

Parece, portanto, haver uma relação entre os resultados acima descritos e o

processo de reparo e osseointegração dos implantes instalados nas tíbias dos animais. Foi verificado que o grupo ALD apresentou maiores valores de torque de remoção dos implantes, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CTL nos períodos entre 10 e 30 dias. Estes resultados estão em acordo com os achados de estudos anteriores que avaliaram o efeito da droga sobre o torque de remoção de implantes em ratas com osteoporose (Narai, Nagahata⁷⁹, 2003) e deficiência de estrógeno (Giro et al.⁴¹, 2007).

Já quanto ao %BIC e %BAFO foram demonstradas diferenças estatisticamente significantes, com maiores valores para o grupo ALD nos períodos de 20, 30, 45 e 60 dias. Tais resultados estão de acordo com estudos que avaliaram o efeito da droga sobre esses parâmetros, em animais com e sem deficiência de estrógeno (Giro et al.⁴¹, 2007; Giro et al.⁴⁰, 2008; Viera-Negrón et al.¹¹⁶, 2008). O efeito positivo do alendronato sobre os parâmetros de avaliação direta da osseointegração (torque de remoção e histometria) podem ser explicados pelo mecanismo de ação da droga. Estudos demonstraram que o medicamento reduz a reabsorção de tecido ósseo devido à sua ação de inibição da ação e da diferenciação osteoclástica (Meraw et al.⁷⁶, 1999; Pozzi et al.⁸⁹, 2009; Stark, Boocock¹⁰⁹, 1995) e estímulo à apoptose dessas células (Park et al.⁸³, 2013). Assim é provável que, após a inserção dos implantes, tenha ocorrido uma menor reabsorção do osso (Toker et al.¹¹¹, 2012; Park et al.⁸³, 2013) ao redor do leito fresado, responsável pela estabilidade primária, mantendo maiores valores de torque de remoção para o grupo ALD nos períodos iniciais comparado ao controle. Além disso, no grupo ALD a formação de tecido ósseo pode ter ocorrido a partir de uma região mais próxima às roscas do implante o que pode explicar os maiores valores de %BIC e %BA em períodos mais tardios sem, necessariamente, ter ocorrido uma maior taxa de formação de tecido ósseo nesse grupo (Reinholz et al.⁹², 2000; Walter et al.¹¹⁹, 2010). Entretanto, outra

hipótese para o aumento da %BIC e % BAFO é o fato da droga poder atuar sobre células pré-osteoblásticas e osteoblastos, aumentando tanto a quantidade dos mesmos como a função dessas células (Duque, Rivas²⁷, 2007; Huja et al.⁴⁵, 2011; Komatsu et al.⁵⁸, 2013).

Quando confrontados os resultados de torque de remoção, %BIC e %BAFO, observa-se que as diferenças estatisticamente significantes entre os grupos não ocorreram, necessariamente, nos mesmos períodos. Nos períodos de 10 e 15 dias o grupo ALD apresentou valores de torque de remoção significativamente maiores, porém sem valores estatisticamente superiores de %BIC e %BAFO. O resultado visto aos 10 dias pode ser explicado pelo fato que não é esperada uma neoformação óssea expressiva, nos períodos iniciais, a ponto de alterar significativamente o %BIC e %BAFO (Marco et al.⁶⁷, 2005), enquanto o torque de remoção inicial é altamente dependente do osso remanescente. Entretanto, à medida em que ocorre o aumento nos períodos de avaliação observa-se a detecção de diferenças no %BIC e %BAFO entre os grupos, sendo os maiores valores pertencentes ao grupo ALD, resultado esse esperado devido aos efeitos da droga sobre o tecido ósseo (Viera-Negron et al.¹¹⁶, 2008). Adicionalmente, deve-se ter em mente que o torque de remoção é um teste que leva em consideração a estabilidade tridimensional da osseointegração, enquanto que as análises de %BIC e %BAFO avaliam uma região específica da interface osso/implante (Faeda et al.²⁸, 2012)

Apesar desses resultados, não foram demonstrados maiores valores na proporção Ca/P para o grupo ALD. Deve-se, entretanto, lembrar que a análise quanto à constituição mineral foi realizada de forma puntual e que, embora tenha sido realizada em diferentes pontos, pode não refletir a composição inorgânica do tecido ósseo como

um todo.

Em função disso, um mapeamento foi realizado para avaliar a distribuição de áreas com maior ou menor grau de mineralização. Na região do osso remanescente foi observado, aos 5 dias, diferença entre grupos quanto à mineralização em algumas regiões, com maior grau para grupo ALD. Tal achado é compatível com o observado por muitos autores em relação ao potencial da droga em diminuir a reabsorção e aumentar a densidade mineral óssea (McLeod et al.⁷⁴, 2012). Como previsto, nesse período foi verificada pequena quantidade de tecido ósseo entre as roscas. Já no período de 10 dias, na região do osso remanescente, observou-se que o grupo CTL apresentou um aumento de áreas mais mineralizadas, sendo entretanto menos homogêneo em relação ao grupo ALD, o que estar relacionado à ausência ou diminuição do processo de remodelação óssea no grupo ALD. Essa observação está de acordo com os achados de Russell¹⁰⁰ (2011) e Im et al.⁴⁷ (2004), quanto à capacidade dos BFs em agir no processo de remodelação óssea e no aumento da densidade mineral desse tecido (McLeod et al.⁷⁴, 2012). No período de 15 dias foi visto, na região entre as roscas, um predomínio de tecido ósseo pouco mineralizado, sendo que para o grupo ALD foram observados poucos espaços vazios entre as roscas, o que sugere maior taxa de formação de tecido ósseo. Segundo Duque, Rivas²⁷ (2007) os BFs podem aumentar não só a osteoblastogênese, mas também a atividade dos osteoblastos o que justifica tal achado. Na região do osso remanescente, pode-se verificar diferença na cor predominante em cada grupo. Assim, para o grupo CTL, observou-se um predomínio da cor verde claro com alguns pontos azul escuro, característicos de tecido ósseo em processo inicial de mineralização. Esse achado sugere que o processo de remodelação óssea está presente na região. Entretanto, no grupo ALD foi observado na região de osso remanescente o predomínio da cor verde escuro, o que sugere a estagnação do processo de remodelação

óssea nessa região, como relatado por Russell¹⁰⁰ (2011).

Aos 20 dias o grupo ALD apresenta tecido ósseo entre as roscas com grau de mineralização mais avançado em relação ao controle, o que está de acordo com os achados de Duque, Rivas ²⁷ (2007), que afirmam que os BFs podem acelerar o processo de mineralização óssea. Os resultados do tecido ósseo remanescente nesse período demonstram que o grupo CTL apresentou predomínio da cor verde escuro, sugerindo aumento da mineralização. Entretanto, no grupo ALD a estagnação do processo de remodelação óssea parece ter sido mantida, uma vez que a região de osso remanescente continuou com predomínio da cor verde escuro.

Um achado importante que pode ser observado no grupo ALD, entre os períodos de 5 e 20 dias, é a manutenção do grau de mineralização na região de osso remanescente. Diante dessa observação e levando-se em consideração que a maior homogeneidade da mineralização pode favorecer o acúmulo e a propagação de microfissuras (Wasserman et al.¹²⁰, 2005; Currey²⁰, 1990), parece razoável concluir que até o período de 20 dias o tecido ósseo dessa região pode estar mais propenso à ocorrência de danos estruturais resultantes da ação de cargas. Além disso, a estagnação da remodelação óssea está associada ao acúmulo de microdanos, (Yamagami et al.¹²³, 2013; Odvina et al.⁸⁰, 2005; Compston ¹⁷, 2011; Shane et al.¹⁰⁷, 2014) dificultando, dessa forma, a reparação natural do tecido ósseo (Allen, Burr³, 2007; Mashiba et al.⁷², 2001). O conjunto desses dados sugere que, até o período de 20 dias, o tecido ósseo remanescente do grupo ALD apresenta menor capacidade de reparação.

As imagens representativas do grupo ALD, nos períodos de 25 e 30 dias, demonstram maior homogeneidade da mineralização do tecido ósseo em todas as regiões (entre roscas e osso remanescente) quando comparado ao grupo CTL nos mesmos

períodos. É possível observar que nesses períodos o grupo ALD apresentou aumento do grau de mineralização da região entre roscas em relação aos períodos anteriores. No período de 45 dias o grupo ALD apresentou, na região de tecido ósseo remanescente, um aumento do grau de mineralização em relação aos períodos de 25 e 30 dias, com manutenção do padrão de homogeneidade. Este fato não ocorreu no grupo CTL que, embora tenha apresentado aumento da mineralização em algumas regiões, manteve um padrão heterogêneo quanto ao grau de mineralização. Essas observações corroboram com os achados de McLeod et al.⁷⁴ (2012), que afirmam haver um aumento do grau de mineralização, e dos achados de Wasserman et al.¹²⁰ (2005) e Currey²⁰ (1990) quanto à ocorrência de homogeneidade da mineralização do tecido ósseo como consequência do uso de BFs.

Finalmente, aos 60 dias o grupo CTL apresentou manutenção do grau de mineralização do tecido ósseo entre as roscas e na região do osso remanescente em relação ao período de 45 dias. O grupo ALD apresentou a mesma tendência em relação ao CTL nesse período, embora com maior grau de mineralização no osso remanescente e maior preenchimento ósseo em algumas roscas.

O conjunto dos dados obtidos a partir do mapeamento da mineralização podem ajudar no entendimento das possíveis causas de falhas de implantes e ocorrência de osteonecrose. De acordo com Boivin et al.¹⁰ (2000), uma maior taxa de mineralização, como observada no grupo ALD, é proveniente da estagnação do processo de remodelação óssea, com consequente aumento da mineralização secundária. Segundo Subramanian et al.¹¹⁰ (2012), uma das hipóteses para a perda de implantes, em pacientes que fazem uso de BFs a longo prazo, pode ser o comprometimento das propriedades mecânicas do tecido ósseo. Tal comprometimento pode estar relacionado ao aumento da

densidade mineral, devido ao fato que o aumento no grau de mineralização, em relação ao máximo normal, só é possível com a redução no conteúdo orgânico do tecido ósseo Boivin et al.¹⁰ (2000). Além disso, a estagnação do processo de remodelação óssea diminui a reparação natural do tecido ósseo (Allen, Burr³, 2007; Mashiba et al.⁷², 2001), o que pode explicar a ocorrência de falhas de implantes e o aparecimento de OMAB.

Como exposto anteriormente, o colágeno é um dos componentes mais abundantes do tecido ósseo, representando de 90 a 98% da matriz orgânica (Lazarovici et al.⁶², 2010; Marx et al.⁶⁹, 2007). Dessa forma, além das análises quanto ao conteúdo mineral e grau de mineralização do tecido ósseo ao redor dos implantes, a avaliação quanto ao grau de organização do colágeno teve como principal objetivo verificar os efeitos do alendronato no arranjo dessas estruturas. Foram constatadas diferenças entre os grupos, em todos os períodos avaliados, em relação à organização do colágeno. De forma geral, o grupo CTL apresentou fibras colágenas melhor organizadas, com espessura superior e arranjo mais estruturado em relação ao grupo ALD. No grupo ALD, os feixes de colágeno apresentaram-se finos e com orientação irregular, com trabéculas ósseas apresentando feixes de colágeno delgados e irregulares. Esses achados demonstram que, apesar do efeito da droga sobre a densidade, propriedades mecânicas e aumento do grau de mineralização, a constituição da matriz colágena do tecido ósseo é prejudicada. Estes achados demonstram que embora haja maior preenchimento das roscas dos implantes, o tecido ósseo formado apresenta qualidade inferior em relação ao animal sem uso da droga. Além disso, a presença de um grau de mineralização maior, em relação ao máximo normal, apresenta próxima relação com a formação de uma matriz orgânica menos organizada e em menor quantidade (Boivin et al.¹⁰, 2000). Estes achados podem interferir diretamente nos processos de reparação, de remodelação óssea e, conseqüentemente, na maior ocorrência de falhas.

De forma geral, nossos dados demonstraram que a administração de alendronato a longo prazo foi eficaz na promoção do aumento do grau de mineralização e da manutenção da estabilidade primária, além do maior preenchimento das roscas do implante por tecido ósseo. Apesar disso, os dados de mapeamento da mineralização, até o período de 20 dias, sugerem uma maior vulnerabilidade do tecido ósseo em suportar cargas e uma provável redução na capacidade de reparo tecidual do osso remanescente. Também, após 30 dias, o ALD promoveu redução do torque de remoção e aumento da rigidez, não resultando portanto em benefícios adicionais à osseointegração dos implantes. Especificamente com relação à rigidez e resiliência, os resultados demonstraram a menor capacidade de deformação elástica do osso em animais do grupo ALD em relação ao CTL, nos últimos períodos, demonstrando que o potencial de suportar cargas não foi melhorado com o aumento da densidade óssea (Jamsa et al.⁵⁰, 2002). Mais do que isso, a avaliação da qualidade do tecido ósseo neoformado demonstrou que o ALD levou a um prejuízo tanto de organização quanto de características estruturais desse tecido.

Cabe ressaltar que estudos têm demonstrado a ocorrência de osteonecrose nos maxilares (Marx et al.⁶⁹, 2007; Ruggiero et al.⁹⁹, 2009) e fraturas atípicas de fêmur (Compston¹⁷, 2011; Rosenthal et al.⁹⁷, 2014; Giannini et al.³⁷, 2013; Shane et al.¹⁰⁷, 2014), associados ao uso de BFs, apesar do aumento da BMD. Isso demonstra que o alto grau de BMD não, necessariamente, é benéfico ao desempenho mecânico ou evita a ocorrência de processos patológicos após procedimentos invasivos (Jacobsen et al.⁴⁹, 2013; Chadha et al.¹⁴, 2013; Zadik et al.¹²⁵, 2012).

Conclusão

CONCLUSÃO

Dentro das limitações do estudo, podemos concluir que o uso do alendronato a longo prazo:

- 1 – Acelerou o processo de reparação dos implantes, apesar do prejuízo quanto à qualidade do tecido ósseo neoformado e do limitado benefício biomecânico;
- 2– Aumentou o grau de mineralização do tecido ósseo ao redor dos implantes e do osso remanescente, apesar de levado à homogeneidade da mineralização;
- 3 – Foi eficaz no aumento da densidade mineral óssea;
- 4 – Resultou em melhora das propriedades mecânicas do tecido ósseo, embora esse efeito não tenha sido mantido até o final do experimento.
- 5 – Apesar do uso do alendronato ter acelerado o processo de reparo dos implantes, a menor organização do colágeno apresentada associada à homogeneidade na mineralização do tecido ósseo, sugere perda da capacidade de remodelação óssea frente às demandas funcionais.

Referências

REFERÊNCIAS*

1. Abtahi J, Agholme F, Sandberg O, Aspenberg P. Effect of local vs. systemic bisphosphonate delivery on dental implant fixation in a model of osteonecrosis of the jaw. *J Dent Res*. 2013; 92(3): 279-83
 2. Ali AA, Weinstein RS, Stewart SA, Parfitt AM, Manolagas SC, Jilka RL. Rosiglitazone causes bone loss in mice by suppressing osteoblast differentiation and bone formation. *Endocrinology*. 2005; 146(3): 1226-35.
 3. Allen MR, Burr DB. Three years of alendronate treatment results in similar levels of vertebral microdamage as after one year of treatment. *J Bone Miner Res*. 2007; 22(11): 1759-65.
 4. 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(1): 56-65.
 5. Allen MR, Gineyts E, Leeming DJ, Burr DB, Delmas PD. Bisphosphonates alter trabecular bone collagen cross-linking and isomerization in beagle dog vertebra. *Osteoporos Int*. 2008; 19(3): 329-37.
 6. 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(3): 508-16.
 7. Ayan M, Dolanmaz D, Mihmanli A, Ayan A, Kurkcu M. The effect of systemically administrated zoledronic acid on the osseointegration of dental implants. *Oral Dis*. 2012; 18(8): 802-8.
 8. Bedogni A, Blandamura S, Lokmic Z, Palumbo C, Ragazzo M, Ferrari F, et al. Bisphosphonate-associated jawbone osteonecrosis: a correlation between imaging techniques and histopathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 105(3): 358-64.
 9. Bellido T, Plotkin LI. Novel actions of bisphosphonates in bone: preservation of osteoblast and osteocyte viability. *Bone*. 2011; 49(1): 50-5.
 10. 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(5): 687-94.
 11. Boskey AL, Coleman R. Aging and bone. *J Dent Res*. 2010; 89(12): 1333-48.
 12. Bullough PG, Vigorita VJ. Atlas of orthopaedic pathology with clinical and radiologic correlations. 2nd ed. New York: Gower Medical; 1992.
- * De acordo com o manual da FOAr/ UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

13. Carvas JS, Pereira RM, Caparbo VF, Fuller P, Silveira CA, Lima LA, et al. A single dose of zoledronic acid reverses the deleterious effects of glucocorticoids on titanium implant osseointegration. *Osteoporos Int.* 2010; 21(10): 1723-9.
14. Chadha GK, Ahmadiéh A, Kumar S, Sedghizadeh PP. Osseointegration of dental implants and osteonecrosis of the jaw in patients treated with bisphosphonate therapy: a systematic review. *J Oral Implantol.* 2013; 39(4): 510-20.
15. Chan GK, Duque G. Age-related bone loss: old bone, new facts. *Gerontology.* 2002; 48(2): 62-71.
16. Chapurlat RD, Arlot M, Burt-Pichat B, Chavassieux P, Roux JP, Portero-Muzy N, et al. Microcrack frequency and bone remodeling in postmenopausal osteoporotic women on long-term bisphosphonates: a bone biopsy study. *J Bone Miner Res.* 2007; 22(10): 1502-9.
17. Compston J. Pathophysiology of atypical femoral fractures and osteonecrosis of the jaw. *Osteoporos Int.* 2011; 22(12): 2951-61.
18. Cooper MS, Syddall HE, Fall CH, Wood PJ, Stewart PM, Cooper C, 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(6): 692-7.
19. Coxon FP, Rogers MJ. The role of prenylated small GTP-binding proteins in the regulation of osteoclast function. *Calcif Tissue Int.* 2003; 72(1): 80-4.
20. Currey JD. Physical characteristics affecting the tensile failure properties of compact bone. *J Biomech.* 1990; 23(8): 837-44.
21. Das S, Crockett JC. Osteoporosis - a current view of pharmacological prevention and treatment. *Drug Des Devel Ther.* 2013; 7: 435-48.
22. Dello Russo NM, Jeffcoat MK, Marx RE, Fugazzotto P. Osteonecrosis in the jaws of patients who are using oral biphosphonates to treat osteoporosis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2007; 22(1): 146-53.
23. Devogelaer JP, Sambrook P, Reid DM, Goemaere S, Ish-Shalom S, Collette J, et al. Effect on bone turnover markers of once-yearly intravenous infusion of zoledronic acid versus daily oral risedronate in patients treated with glucocorticoids. *Rheumatology.* 2013; 52(6): 1058-69.
24. 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(4): 318-26.
25. 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(1): 107-14.

26. Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, Luckman SP, Hahn FM, Poulter CD, et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 296(2): 235-42.
27. Duque G, Rivas D. Alendronate has an anabolic effect on bone through the differentiation of mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res.* 2007; 22(10): 1603-11.
28. Faeda RS, Spin-Neto R, Marcantonio E, Guastaldi AC, Marcantonio E Jr. Laser ablation in titanium implants followed by biomimetic hydroxyapatite coating: histomorphometric study in rabbits. *Microsc Res Tech.* 2012; 75(7): 940-8.
29. Fazil M, Baboota S, Sahni JK, Aameeduzzafar, Ali J. Bisphosphonates: therapeutics potential and recent advances in drug delivery. *Drug Deliv.* 2014 Jan 10. [Epub ahead of print].
30. Fleisch H. Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res.* 2002; 4(1): 30-4.
31. Fleisch H, Bisaz S. Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. *Am J Physiol.* 1962; 203: 671-5.
32. Fratzl P, Gupta HS, Paschalis EP, Roschger P. Structure and mechanical quality of the collagen-mineral nano-composite in bone. *J Mater Chem.* 2004; 14(14): 2115-23.
33. 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(9): 1358-67.
34. Gallacher SJ, Dixon T. Impact of treatments for postmenopausal osteoporosis (bisphosphonates, parathyroid hormone, strontium ranelate, and denosumab) on bone quality: a systematic review. *Calcif Tissue Int.* 2010; 87(6): 469-84.
35. Gamsjaeger S, Hofstetter B, Zwettler E, Recker R, Gasser JA, Eriksen EF, et al. Effects of 3 years treatment with once-yearly zoledronic acid on the kinetics of bone matrix maturation in osteoporotic patients. *Osteoporos Int.* 2013; 24(1): 339-47.
36. 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(2): 225-32.
37. Giannini S, Chiarello E, Tedesco G, Cadossi M, Luciani D, Mazzotti A, et al. Atypical femoral fractures. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2013; 10(1): 30-3.
38. Gimble JM, Zvonic S, Floyd ZE, Kassem M, Nuttall ME. Playing with bone and fat. *J Cell Biochem.* 2006; 98(2): 251-66.
39. Giro G, Coelho PG, Pereira RM, Jorgetti V, Marcantonio E Jr, Orrico SR. The effect of oestrogen and alendronate therapies on postmenopausal bone loss around osseointegrated titanium implants. *Clin Oral Implants Res.* 2011; 22(3): 259-64.

40. 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(2): 162-7.
41. 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(7):1316-21.
42. Goes P, Melo IM, Dutra CS, Lima AP, Lima V. Effect of alendronate on bone-specific alkaline phosphatase on periodontal bone loss in rats. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(11): 1537-44.
43. Gupta R. Early dental implant failure in patient associated with oral bisphosphonates. *Indian J Dent Res.* 2012; 23(2): 298.
44. Hiroi-Furuya E, Kameda T, Hiura K, Mano H, Miyazawa K, Nakamaru Y, et al. Etidronate (EHDP) inhibits osteoclastic-bone resorption, promotes apoptosis and disrupts actin rings in isolate-mature osteoclasts. *Calcif Tissue Int.* 1999; 64(3): 219-23.
45. 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(3): 363-9.
46. Iglesias JE, Salum FG, Figueiredo MA, Cherubini K. Important aspects concerning alendronate-related osteonecrosis of the jaws: a literature review. *Gerodontology.* 2013 Nov 21. [Epub ahead of print].
47. Im GI, Qureshi SA, Kenney J, Rubash HE, Shanbhag AS. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials.* 2004; 25(18): 4105–15.
48. Iwamoto N, Inaba Y, Kobayashi N, Yukizawa Y, Ike H, Ishida T, et al. The effectiveness of mono or combined osteoporosis drug therapy against bone mineral density loss around femoral implants after total hip arthroplasty. *J Bone Miner Metab.* 2013 Nov 15. [Epub ahead of print].
49. Jacobsen C, Metzler P, Rossle M, Obwegeser J, Zemmann W, Gratz KW. Osteopathology induced by bisphosphonates and dental implants: clinical observations. *Clin Oral Investig.* 2013; 17(1): 167-75.
50. Jamsa T, Rho JY, Fan Z, MacKay CA, Marks SC Jr, Tuukkanen J. Mechanical properties in long bones of rat osteopetrotic mutations. *J Biomech.* 2002; 35(2): 161-5.
51. Janner M, Muhlbauer RC, Fleisch H. Sodium EDTA enhances intestinal absorption of two bisphosphonates. *Calcif Tissue Int.* 1991; 49(4): 280-3.
52. Jeffcoat MK. Safety of oral bisphosphonates: controlled studies on alveolar bone. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2006; 21(3): 349-53.
53. Jowsey J. The bone biopsy. New York: Springer; 1977. 164 p.

54. Jowsey J. Autoradiographic and microradiographic studies of bone. In: Zipkin I. Biological mineralization. New York: Wiley; 1973. p. 297–333.
55. Killeen AC RP, Schmid MJ, Zhang Y, Narayana N, Marx DB, Payne JB, et al. Impact of local and systemic alendronate on simvastatin-induced new bone around periodontal defects. *J Periodontol*. 2012; 83(12): 1463-71.
56. Kim MS, Kim JH, Lee MR, Kang JH, Kim HJ, Ko HM, et al. Effects of alendronate on a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs expression in the developing epiphyseal cartilage in rats. *Anat Histol Embryol*. 2009; 38(2): 154-60.
57. Klein BY, Ben-Bassat H, Breuer E, Solomon V, Golomb G. Structurally different bisphosphonates exert opposing effects on alkaline phosphatase and mineralization in marrow osteoprogenitors. *J Cell Biochem*. 1998; 68(2): 186-94.
58. Komatsu K, Shimada A, Shibata T, Wada S, Ideno H, Nakashima K, et al. Alendronate promotes bone formation by inhibiting protein prenylation in osteoblasts in rat tooth replantation model. *J Endocrinol*. 2013; 219(2): 145-58.
59. Kunchur R, Need A, Hughes T, Goss A. Clinical investigation of C-terminal cross-linking telopeptide test in prevention and management of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009; 67(6):1167-73.
60. Kuroshima S, Elliott KW, Yamashita J. Effect of zoledronate on the responses of osteocytes to acute parathyroid hormone. *Calcif Tissue Int*. 2013; 92(6): 576-85.
61. 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(2): 204-10.
62. Lazarovici TS, Mesilaty-Gross S, Vered I, Pariente C, Kanety H, Givol N, et al. Serologic bone markers for predicting development of osteonecrosis of the jaw in patients receiving bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010; 68(9): 2241-7.
63. Lee CA, Einhorn TA. The bone organ system: form and function. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J. Osteoporosis. 2nd. ed. San Diego: Academic Press; 2007 .v.1, p. 3-19.
64. Lee SJ, Oh TJ, Bae TS, Lee MH, Soh Y, Kim BI, et al. Effect of bisphosphonates on anodized and heat-treated titanium surfaces: an animal experimental study. *J Periodontol*. 2011; 82(7): 1035-42.
65. Lindtner RA, Tiaden AN, Gnelin K, Ebner HL, Manzl C, Klawitter M, et al. Osteoanabolic effect of alendronate and zoledronate on bone marrow stromal cells (BMSCs) isolated from aged female osteoporotic patients and its implications for their mode of action in the treatment of age related bone loss. *Osteoporos Int*. 2014; 25(3): 1151-61.

66. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res.* 1998; 13(4): 581-9.
67. Marco F, Milena F, Gianluca G, Vittoria O. Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. *Micron.* 2005; 36(7-8): 630-44.
68. Marolt D, Cozin M, Vunjak-Novakovic G, Cremers S, Landesberg R. Effects of pamidronate on human alveolar osteoblasts in vitro. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012; 70(5): 1081-92.
69. Marx RE, Cillo JE Jr, Ulloa JJ. Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65(12): 2397-410.
70. Masarachia P WM, Balena R, Rodan GA. Comparison of the distribution of 3H-alendronate and 3H-etidronate in rat and mouse bones. *Bone.* 1996; 19(3): 281-90.
71. 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(4): 613-20.
72. Mashiba T, Turner CH, Hirano T, Forwood MR, Johnston CC, Burr DB. Effects of suppressed bone turnover by bisphosphonates on microdamage accumulation and biomechanical properties in clinically relevant skeletal sites in beagles. *Bone.* 2001; 28(5): 524-31.
73. Mattheos N, Caldwell P, Petcu EB, Ivanovski S, Reher P. Dental implant placement with bone augmentation in a patient who received intravenous bisphosphonate treatment for osteoporosis. *J Can Dental Assoc.* 2013; 79: d2.
74. McLeod NM, Brennan PA, Ruggiero SL. Bisphosphonate osteonecrosis of the jaw: a historical and contemporary review. *Surgeon.* 2012; 10(1): 36-42.
75. Memon S, Weltman RL, Katancik JA. Oral bisphosphonates: early endosseous dental implant success and crestal bone changes. A retrospective study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2012; 27(5): 1216-22.
76. Meraw SJ, Reeve CM, Wollan PC. Use of alendronate in peri-implant defect regeneration. *J Periodontol.* 1999; 70(2): 151-8.
77. Monkkonen H, Auriola S, Lehenkari P, Kellinsalmi M, Hassinen IE, Vepsäläinen J, et al. A new endogenous ATP analog (ApppI) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. *Br J Pharmacol.* 2006; 147(4): 437-45.
78. Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W, et al. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone.* 2006; 38(5): 617-27.

79. 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(2): 218-23.
80. 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(3): 1294-301.
81. de Oliveira MA, Asahi DA, Silveira CA, Lima LA, Glick M, Gallottini M. The effects of zoledronic acid and dexamethasone on osseointegration of endosseous implants: histological and histomorphometrical evaluation in rats. *Clin Oral Implants Res*. 2014 Jan 20. [Epub ahead of print]. doi: 10.1111/clr.12335.
82. Ory S, Brazier H, Pawlak G, Blangy A. Rho GTPases in osteoclasts: orchestrators of podosome arrangement. *Eur J Cell Biol*. 2008; 87(8-9): 469-77.
83. Park R, Kim JH, Choi H, Park YB, Jung HS, Moon HS. Effect of alendronate on bone remodeling around implant in the rat. *J Adv Prosthodont*. 2013; 5(4): 374-81.
84. Paschalis EP. Fourier transform infrared analysis and bone. *Osteoporos Int*. 2009; 20(6): 1043-7.
85. Pavlos NJ, Xu J, Riedel D, Yeoh JS, Teitelbaum SL, Papadimitriou JM, et al. Rab3D regulates a novel vesicular trafficking pathway that is required for osteoclastic bone resorption. *Mol Cell Biol*. 2005; 25(12): 5253-69.
86. Peter B, Pioletti DP, Laib S, Bujoli B, Pilet P, Janvier P, et al. Calcium phosphate drug delivery system: influence of local zoledronate release on bone implant osteointegration. *Bone*. 2005; 36(1): 52-60.
87. Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. Dissociation of the pro-apoptotic effects of bisphosphonates on osteoclasts from their anti- apoptotic effects on osteoblasts/osteocytes with novel analogs. *Bone*. 2006; 39(3): 443-52.
88. 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(5): E396-400.
89. Pozzi S, Vallet S, Mukherjee S, Cirstea D, Vaghela N, Santo L, et al. High-dose zoledronic acid impacts bone remodeling with effects on osteoblastic lineage and bone mechanical properties. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(18): 5829-39.
90. Qing H, Ardesirpour L, Pajevic PD, Dusevich V, Jahn K, Kato S, et al. Demonstration of osteocytic perilacunar/canalicular remodeling in mice during lactation. *J Bone Miner Res*. 2012; 27(5): 1018-29.
91. Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition*. 2005; 21(6): 775-7.

92. Reinholz GG, Getz B, Pederson L, Sanders ES, Subramaniam M, Ingle JN, et al. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Res.* 2000; 60(21): 6001-7.
93. Robey PG, Boskey AL. The composition of bone. In: Rosen CJ, editor. *Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism.* 7th ed. Washington: American Society for Bone and Mineral Research; 2008. p. 32-7.
94. Rogers MJ, Ji X, Russell RG, Blackburn GM, Williamson MP, Bayless AV, et al. Incorporation of bisphosphonates into adenine nucleotides by amoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Biochem J.* 1994; 303(Pt 1): 303-11.
95. Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Monkkonen J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone.* 2011; 49(1): 34-41.
96. 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(2): 185-91.
97. Rosenthal Y, Arami A, Kosashvili Y, Cohen N, Sidon E, Velkes S. Atypical fractures of the femur related to prolonged treatment with bisphosphonates for osteoporosis. *Isr Med Assoc J.* 2014; 16(2): 78-82.
98. Ruggiero SL, Carlson ER, Assael LA. Comprehensive review of bisphosphonate therapy: implications for the oral and maxillofacial surgery patient. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009; 67(5 Suppl): 1.
99. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw - 2009 update. *Aust Endod J.* 2009; 35(3): 119-30.
100. Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone.* 2011; 49(1): 2-19.
101. 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(6): 733-59 .
102. 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(5): 961-9.
103. Saito M, Mori S, Mashiba T, Komatsubara S, Marumo K. Collagen maturity, glycation induced-pentosidine, and mineralization are increased following 3-year treatment with incadronate in dogs. *Osteoporos Int.* 2008; 19(9): 1343-54.
104. Sato M, Grasser W. Effects of bisphosphonates on isolated rat osteoclasts as examined by reflected light microscopy. *J Bone Miner Res.* 1990; 5(1): 31-40.

105. Schibler D, Russell RG, Fleisch H. Inhibition by pyrophosphate and polyphosphate of aortic calcification induced by vitamin D3 in rats. *Clin Sci*. 1968; 35(2): 363-72.
106. Schwarz P, Jorgensen NR, Abrahamsen B. Status of drug development for the prevention and treatment of osteoporosis. *Expert Opin Drug Discov*. 2014; 9(3): 245-53.
107. Shane E, Burr D, Abrahamsen B, Adler RA, Brown TD, Cheung AM, et al. Atypical subtrochanteric and diaphyseal femoral fractures: second report of a task force of the american society for bone and mineral research. *J Bone Miner Res*. 2014; 29(1): 1-23.
108. Starck WJ, Epker BN. Failure of osseointegrated dental implants after diphosphonate therapy for osteoporosis: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1995; 10(1): 74-8.
109. Stark WM, Boocock MR. Gatecrashers at the catalytic party. *Trends Genet*. 1995; 11(4): 121-3.
110. Subramanian G, Fritton JC, Iyer S, Quek SY. Atypical dental implant failure with long-term bisphosphonate treatment--akin to atypical fractures? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012; 114(6): e30-5.
111. Toker H, Ozdemir H, Ozer H, Eren K. Alendronate enhances osseous healing in a rat calvarial defect model. *Arch Oral Biol*. 2012; 57(11): 1545-50.
112. Tolia M, Zygogianni A, Kouvaris JR, Meristoudis C, Margari N, Karakitsos P, et al. The key role of bisphosphonates in the supportive care of cancer patients. *Anticancer Res*. 2014; 34(1): 23-37.
113. Tsetsenekou E, Papadopoulos T, Kalyvas D, Papaioannou N, Tangl S, Watzek G. The influence of alendronate on osseointegration of nanotreated dental implants in New Zealand rabbits. *Clin Oral Implants Res*. 2012; 23(6): 659-66.
114. 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(5): 722-9.
115. Verron E, Gauthier O, Janvier P, Pilet P, Lesoueur J, Bujoli B, et al. In vivo bone augmentation in an osteoporotic environment using bisphosphonate-loaded calcium deficient apatite. *Biomaterials*. 2010; 31(30): 7776-84.
116. 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(2): 76-82.
117. de Villiers TJ, Gass MLS, Haines CJ, Hall JE, Lobo RA, Pierroz DD, et al. Global consensus statement on menopausal hormone therapy. *Maturitas*. 2013; 74(4): 391-2.

118. von Knoch F, Jaquiere C, Kowalsky M, Schaeren S, Alabre C, Martin I, et al. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials*. 2005; 26(34): 6941-9.
119. Walter C, Klein MO, Pabst A, Al-Nawas B, Duschner H, Ziebart T. Influence of bisphosphonates on endothelial cells, fibroblasts, and osteogenic cells. *Clin Oral Investig*. 2010; 14(1): 35-41.
120. Wassermann N, Yerramshetty J, Akkus O. Microcracks colocalize within highly mineralized regions of cortical bone tissue. *Eur J Morphol*. 2005; 42(1-2): 43-51.
121. Watts NB, Diab DL. Long-term use of bisphosphonates in osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95(4): 1555-65.
122. Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O'Brien CA. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med*. 2011; 17(10): 1235-41.
123. Yamagami Y, Mashiba T, Iwata K, Tanaka M, Nozaki K, Yamamoto T. Effects of minodronic acid and alendronate on bone remodeling, microdamage accumulation, degree of mineralization and bone mechanical properties in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Bone*. 2013; 54(1): 1-7.
124. 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(3): 515-23.
125. Zadik Y, Abu-Tair J, Yarom N, Zaharia B, Elad S. The importance of a thorough medical and pharmacological history before dental implant placement. *Aust Dent J*. 2012; 57(3): 388–92.

Anexos

DECLARAÇÃO

DECLARO, para os devidos fins, que a CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade de Odontologia, recebeu o projeto **"AVALIAÇÃO DA REPARAÇÃO E MINERALIZAÇÃO ÓSSEA EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM ALENDRONATO"** (Processo CEEA nº 16/2010), apresentado pela Pesquisadora Profa. Dra. SILVANA REGINA PEREZ ORRICO. O referido projeto deu entrada nesta Comissão em 20/05/2010, não apresenta pendências até o momento, e seu relatório final deverá ser entregue em JULHO/2014.

Araraquara, 07 de fevereiro de 2014.


Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
Coordenador da CEUA

