JANAINA SANTOS BADIN CARVAS

**Efeito do metotrexato, do corticosteróide e do ácido
zoledrônico na osseointegração de implantes de titânio
em um modelo de tíbias de coelhos**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências**

Área de concentração: Reumatologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Suzana Beatriz Veríssimo de Mello

São Paulo

2007

à Deus

aos meus pais Eliete e Antonio Miguel

ao meu irmão Tiago

à minha avó Amália

aos meus sogros Neide e Augusto

às minhas cunhadas Luciana e Valéria

por todo o amor, incentivo e

compreensão,

e principalmente ao meu marido Sergio,

pelo amor e apoio incondicional.

à Prof^a Dr^a Suzana Beatriz Veríssimo de Mello, pela
oportunidade, pelo aprendizado, pelo empenho na
realização de todos os passos deste trabalho e
principalmente pela amizade e incentivo a mim dedicados

à Prof^a Dr^a Rosa Maria Rodrigues Pereira pelo estímulo, pela valiosa colaboração, por tudo que me ensinou, e principalmente pelo cuidado e carinho a mim dedicados

AGRADECIMENTOS

Pela participação na minha vida acadêmica, profissional e pessoal, e pelo apoio fundamental na realização deste trabalho

Prof^a Dr^a Eloísa Silva Dutra de Oliveira Bonfá

Prof^a Dr^a Vanda Jorgetti

Prof Dr Luiz Antonio Pugliesi Alves de Lima

Dr^a Walcy Rosolia Teodoro

Dr^a Ieda Maria Magalhães Laurindo

Dr José Maria Benozatti

Dr^a Celey Aparecida Eugênio Silveira

Maria Aurora Gomes da Silva

Maria de Fátima de Almeida

Valéria de Falco

Priscila Fuller

Liliam Takayama

Maria de Fátima Correia da Silva

Dr Eduardo Pompeu

Maria Luiza Guzzo Valenti

Antonio dos Santos Filho

Romildo Dias Lima

Luciano Lopes

à FAPESP pelo apoio á pesquisa 06/57383-5

à CAPES pela bolsa concedida

à Conexão Sistema de Prótese Ltda. pela doação dos implantes

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Resumo

Summary

1. Introdução	01
2. Objetivos	16
3. Material e métodos	18
3.1. Animais	19
3.2. Implantes	20
3.3. Avaliação ponderal	21
3.4. Terapia medicamentosa	21
3.5. Análise hematológica	22
3.6. Densitometria óssea	23
3.7. Procedimento cirúrgico	25
3.8. Obtenção das peças	27
3.9. Processamento histológico	27
3.10. Análise histomorfométrica	29
3.11. Análise estatística	30
4. Resultados	32
4.1. Avaliação ponderal	33
4.2. Contagem total e diferencial dos leucócitos	34
4.3. Densitometria óssea obtida de L4-L5.....	35
4.4. Densitometria óssea das tíbias	39

4.5. Análise histomorfométrica.....	43
5. Discussão.....	50
6. Conclusões.....	59
7. Referências.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

AF- ácido folínico

AR- artrite reumatóide

CT- controle

CE- corticosteróide

DIBUT- dibutilfitalato

DNA- ácido desoxirribonucléico

DXA - densitometria de dupla emissão de raios X

DMO – densidade mineral óssea

Δ DMO- variação da DMO

MN – linfo-mononucleares

MMA- metilmetacrilato

MMP- metaloproteinases da matriz

MTX- metotrexato

MTX -AF- metotrexato – ácido folínico

MTX-CE- metotrexato – corticosteróide

NZW- New Zealand White

PMN – polimorfonucleares

TiO₂ - dióxido de titânio

ZOL- ácido zoledrônico

RESUMO

Carvas JSB. Efeito do metotrexato, do corticosteróide e do ácido zoledrônico na osseointegração de implantes de titânio em um modelo de tíbias de coelhos. São Paulo, 2007. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo

No presente estudo avaliamos a influência do Metotrexato (MTX – 3mg/kg/semana) e do Corticosteróide (CE- prednisona 1,05 mg/kg/semana), ministrados de forma isolada, associados entre si, ou associados ao Ácido Folínico (AF- 0,25 mg/kg/semana) e ao Ácido Zoledrônico (ZOL- 0,1mg/kg dose única) respectivamente, na osseointegração de implantes de titânio realizados 6 semanas após o início da administração das drogas, em coelhos NZW. Os animais ($2,67 \pm 0,67$ Kg) foram tratados durante um total de 18 semanas com solução salina (CTL; n=6), MTX (n=6), CE (n=8), MTX-CE (n=6), MTX-AF (n=6) e CE-ZOL (n=6). Foram realizadas análises de densitometria mineral óssea (DMO) na tíbia e na coluna antes e após os tratamentos para avaliação da variação da DMO (Δ DMO). Os resultados revelaram perda de osso cortical nos grupos tratados com CE (Δ DMO tíbia: $0,018 \pm 0,010$ vs CTL: $0,040 \pm 0,011$ $p=0,001$; Δ DMO coluna: $0,004 \pm 0,011$ vs CTL: $0,055 \pm 0,009$ $p=0,009$). A adição de ZOL ao CE reverteu a perda de DMO (Δ DMO tíbia: $0,027 \pm 0,003$ $p=0,002$ em relação ao CE; Δ DMO coluna: $0,043 \pm 0,011$ $p=0,02$ em relação ao CE). O tratamento com MTX não promoveu alteração da DMO. As análises histomorfométricas das tíbias com e sem o implante, foram realizadas 12 semanas após a colocação dos implantes, e os resultados mostraram uma

redução de espessura cortical e de tecido ósseo em função do tratamento com CE sendo que a adição de ZOL reverteu também esse parâmetro. Da mesma forma, o percentual de contato entre osso e o implante foi alterado pelo tratamento com CE (CE: 25,98 % vs. CTL: 42,40%; $p=0,013$) e o ZOL reverteu esse efeito (CE- ZOL: 38,95% vs. CE: 25,98%; $p=0,014$). Em conjunto, nossos resultados mostraram que a terapia com MTX não alterou a osseointegração de implantes de titânio, enquanto que o CE promoveu uma diminuição de contato entre osso e implante que foi revertida pela administração de ZOL, comprovando a eficácia terapêutica dessa associação.

SUMMARY

Carvas JSB. Osseointegration of titanium implants in the rabbit tibia model: effect of methotrexate, corticosteroid and zoledronic acid. São Paulo, 2007. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo

In this study we evaluated the influence of Methotrexate (MTX- 3mg/kg/week) and Corticosteroid (CE- prednisona 1, 05 mg/kg/week), alone and in association with Folinic Acid (FA- 0, 25 mg/kg/week) and Zoledronic Acid (ZOL- 0,1mg/kg/week) respectively, on osseointegration of titanium dental implants performed 6 weeks after treatment started in adult male NZW rabbits. Six animals in each group and eight in CE, were treated with the drugs during 18 weeks with exception of ZOL, which was infused as a single dose, at the moment of surgery. Dual-energy X-ray absorptiometryies were performed before and after treatment to determine bone mineral density alterations (Δ BMD). After 12 weeks post-implant placement, the animals were sacrificed for histomorphometric analysis. The BMD was significantly reduced by treatment with CE (Δ tibia: 0.018 ± 0.010 vs CTL: 0.040 ± 0.011 ; Δ lumbar: 0.004 ± 0.011 vs CTL: 0.055 ± 0.009), with recovery of BMD after ZOL administration (Δ tibia: $0,027 \pm 0,003$ vs CE: $0,018 \pm 0,010$; Δ lumbar: 0.043 ± 0.011 vs CE: 0.004 ± 0.011). The BMD was not altered by MTX treatment or MTX-FA. The histomorphometric analysis revealed cortical bone loss and reduction in bone tissue in tibia in animals treated with CE, and these parameters were reversed by ZOL. Similarly, the percentage of bone to implant contact was reduced in the group treated with CE (CE: 25.98% vs. CTL: 42.40%; $p=0.013$), and reverted by ZOL (CE+ZOL: 38.95% vs. CE: 25.98%; $p=0.014$).The MTX and MTX-FA

treatments did not alter osseointegration of the implant (35.09% and 35.92% respectively). Together our results showed that therapy with MTX did not interfere on osseointegration of titanium implants, while the CE reduced the bone to implant contact. ZOL administration reversed this effect, showing the therapeutic importance of this association.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

Implantologia oral é o termo utilizado, atualmente, para denominar o estudo da inserção de materiais aloplásticos no interior dos ossos da maxila e da mandíbula, a fim de proporcionar suporte e retenção para próteses que irão substituir os dentes perdidos. Este tratamento se torna possível graças à osseointegração.

A osseointegração é uma conexão direta, estrutural e funcional, entre osso vivo e organizado e a superfície de um implante, que possa ser submetido à carga, sem evidência de tecido conjuntivo separando as camadas entre osso e o implante. Para se obter a osseointegração, os implantes utilizados devem ser biocompatíveis, e devem apresentar estabilidade primária ao serem ancorados no tecido ósseo (Spiekermann, 2000).

O primeiro protocolo utilizado para se alcançar a osseointegração dos implantes dentais determinava inicialmente, um período de cicatrização óssea de três a seis meses, sem aplicação de cargas funcionais sobre o implante, bem como o emprego de técnicas cirúrgicas atraumáticas, evitando o superaquecimento do osso e preservando assim, a integridade do tecido periimplantar (Branemark et al., 1977).

O material mais utilizado na Implantodontia é o titânio. Os implantes de titânio são protegidos por uma camada superficial de dióxido de titânio (TiO_2), que se forma espontaneamente na presença de ar e água, protegendo da corrosão, o metal da camada imediatamente abaixo. Esse fenômeno representa um fator essencial de biocompatibilidade para os metais utilizados como biomateriais (Ratner, 2001).

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado, composto por células, matriz protéica e minerais. A porção mineral do osso é composta principalmente de fosfato de cálcio, e a porção orgânica, principalmente de colágeno tipo I. O colágeno tipo I é uma proteína com estrutura de tripla hélice, formada por duas cadeias de polipeptídeo do tipo $\alpha 1$, e uma cadeia $\alpha 2$. O colágeno pode ser degradado pelas atividades enzimáticas da fosfatase ácida, da leucina amino peptidase, da collagenase e das metaloproteinases da matriz (MMP). A porção celular é composta pelos osteoblastos, células responsáveis pela síntese e mineralização do tecido ósseo, pelos osteócitos, que são osteoblastos maduros, que não secretam mais matriz orgânica e ficam aprisionados na matriz óssea, e pelos osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea (Branemark, 2005).

Os osteoclastos reabsorvem osso secretando ácidos e enzimas proteolíticas numa lacuna extracelular de reabsorção. Dois grandes grupos de proteinases (MMP e proteinases de cisteína) atuam de forma fundamental na degradação da matriz orgânica (Parikka et al., 2001). As MMP têm sido implicadas em várias patologias devido à sua capacidade de clivar proteínas da matriz extracelular. O balanço entre as MMP e seus inibidores teciduais parece ter papel fundamental na destruição do tecido conjuntivo, associada à diversas patologias, entre as quais a Periodontite, a Artrite, e a Osteoporose.

As MMP representam a família das proteinases de degradação do tecido ósseo, e estão envolvidas tanto na destruição patológica, como na remodelação tecidual associada ao desenvolvimento e à cicatrização (Sallo et al., 1994).

A cicatrização óssea do implante é precedida pelo sangramento proveniente do preparo cirúrgico, e conseqüente formação do coágulo sanguíneo, que representa o arcabouço para o tecido reparador. O coágulo começa a se organizar com o surgimento de capilares e pré-osteoblastos que se formam no seu interior. A retenção do coágulo pela superfície do implante é considerada um pré-requisito essencial para a migração de células osteogênicas para a superfície do implante.

A migração de células osteogênicas para a superfície do implante, através de uma estrutura temporária de tecido conjuntivo, é denominada osseocondução, e pode ser considerada a fase inicial da osseointegração.

Na segunda fase da osseointegração, ocorre a formação óssea, que é o recrutamento e a migração de células com potencial osteogênico, em direção ao implante. A translocação de osteoblastos polarizados, secretores ativos, com produção de matriz concomitante, é chamada acréscimo ou crescimento aposicional (Carvalho e Ponzoni, 2002).

De acordo com Davies, 2000, uma nova formação de osso que ocorre durante o crescimento aposicional, pode ser chamada de formação óssea “de novo”, e se refere a uma cascata biológica de eventos, que ocorre durante o início da formação óssea, por novas populações de células osteogênicas em diferenciação. No estágio seguinte, a remodelação óssea, ocorre a formação da interface osso-implante e a estabilidade do implante em longo prazo.

A remodelação óssea deve ocorrer continuamente na interface osso-implante. O osteoclasto tem a função de limpar a superfície do implante secretando enzimas hidrolíticas que formarão lacunas de reabsorção, permitindo o depósito de tecido ósseo pelos osteoblastos.

A osseointegração é essencialmente um processo cicatricial, e por essa razão, condições sistêmicas que afetem a cicatrização óssea podem diminuir o potencial de osseointegração.

O insucesso da osseointegração é freqüentemente relacionado a fatores biológicos (Legeros & Craig, 1993; El Askary et al., 1999; Misch, 2000; Elsubeihi & Zarb, 2002; Weng, 2003), e, principalmente nas falhas precoces, onde a perda do implante acontece antes da sua ativação, a influência dos fatores relacionados à saúde geral do paciente parece ser de fundamental importância.

Com o aumento da expectativa de vida, é cada vez mais comum encontrarmos pacientes necessitando de tratamentos cirúrgicos ortopédicos para reabilitar a função de ossos e articulações. Estas necessidades podem estar relacionadas à Osteoporose, uma doença esquelética sistêmica caracterizada pela redução da massa óssea e deterioração da sua micro-arquitetura. O aumento da fragilidade óssea provoca uma maior suscetibilidade à fraturas. O aparecimento da Osteoporose pode ocorrer devido à idade avançada, à doenças sistêmicas, à terapias medicamentosas, e no caso das mulheres, devido à menopausa (Fini et al., 2004; Von Wowern, 2001).

Estes pacientes também procuram a reabilitação dos dentes perdidos, e é cada vez mais freqüente o aparecimento de pacientes com algum comprometimento sistêmico necessitando de cirurgias de implantes de titânio para sua reabilitação oral.

A remodelação óssea é um processo contínuo, porém, a massa óssea é aumentada na juventude e diminui com o envelhecimento. O pico de massa óssea é normalmente atingido entre 35 e 40 anos, e é 30% maior nos homens.

A perda do osso trabecular nas mulheres é maior que nos homens da mesma faixa etária, e nos primeiros anos após a menopausa a perda óssea é mais rápida. Com relação à crista óssea remanescente nos maxilares, as mulheres apresentam uma porcentagem maior de reabsorção do rebordo alveolar quando comparadas aos homens. A diminuição dos níveis de estrógeno na menopausa tem sido associada a uma perda de densidade óssea, e a um risco aumentado de doença periodontal e perda dentária (Kazmierczak et al., 2005).

Relacionando a Osteoporose à alteração do rebordo alveolar e à consequente perda de estrutura de suporte dos dentes, observou-se que nessas situações, a idade e fatores hormonais têm uma consequência negativa para a manutenção dos dentes e do rebordo alveolar remanescente (Sanfillipo & E Bianchi, 2003). Mulheres com Osteoporose têm risco aumentado de perda óssea e perda de inserção gengival, o que pode ser atenuado pela reposição hormonal. O osso cortical da mandíbula feminina é mais fino que a masculina, e a menopausa diminui a densidade do osso medular. Além disso, a deficiência de estrógeno interfere de forma negativa na osseointegração de implantes na reabilitação oral destas pacientes. (Grodstein et al., 1998; Payne et al., 1999; Ronderos et al., 2000; Kasugai, 2006).

Fujimoto et al., 1996, mostraram um relato de caso onde uma paciente com Osteoporose recebeu 5 implantes para a reabilitação da arcada inferior. O tratamento foi realizado de forma convencional, tendo como único diferencial, um maior intervalo entre a fase cirúrgica e a instalação das próteses, de forma que o período de cicatrização óssea dos implantes sem aplicação de carga foi de 6 meses, e não de 3 meses, como preconizado habitualmente nos implantes inseridos na mandíbula. O tratamento foi realizado com sucesso.

A osseointegração de implantes de titânio foi avaliada em um modelo experimental, onde coelhas foram submetidas à cirurgia de remoção dos ovários, e desenvolveram Osteoporose devido à perda de estrógeno. Neste modelo, a alteração de massa óssea foi observada na análise de densitometria óssea realizada na coluna, e os achados histomorfométricos mostraram uma diminuição significativa na espessura do osso cortical da tíbia que recebeu o implante, bem como diminuição nos índices de mineralização óssea e maior formação de tecido osteóide no grupo osteoporótico. Entretanto, os índices de contato osso-implante foram semelhantes para ambos os grupos (Lugero et al., 2000).

A Osteoporose também pode ser desencadeada por terapias medicamentosas que influenciam o metabolismo ósseo, e da mesma maneira, estas drogas podem afetar a osseointegração de implantes de titânio.

O metotrexato (MTX) é um agente imunossupressor com propriedades antiproliferativas baseadas na inibição da conversão do ácido fólico em ácido tetraidrofólico, por uma interação competitiva com a enzima dihidrofolato reductase, inibindo a síntese de DNA. Em baixas doses, o MTX é considerado um agente antiinflamatório, e é amplamente utilizado para o tratamento de doenças reumatológicas (Novaes et al., 1996; Mello et al., 2000). Apesar de o seu efeito terapêutico estar bem estabelecido, sua ação sobre o tecido ósseo permanece controversa. A administração concomitante de ácido folínico (AF) com o MTX tem mostrado efeitos benéficos, reduzindo os efeitos colaterais gastrointestinais, hepáticos e orais (Laurindo et al., 2003).

Em estudos experimentais, May et al., 1994, estudaram os efeitos de baixas doses de MTX no metabolismo ósseo através de análise histomorfométrica,

e de marcadores séricos de formação e reabsorção óssea em ratos, que receberam semanalmente doses de 3 mg/kg de MTX durante 16 semanas. Foram realizados também exames de densitometria óssea. Os autores concluíram que a administração prolongada de MTX causou osteopenia por supressão da atividade osteoblástica e estimulação dos osteoclastos, o que promoveu um aumento na reabsorção óssea. Estes achados foram suportados pelos dados obtidos a partir da análise bioquímica do sangue e da histomorfometria, que também mostrou a diminuição do volume trabecular ósseo no osso medular. Os resultados da densitometria óssea, porém, não detectaram a osteopenia, pois o MTX não afetou a porção cortical do osso destes animais.

Em geral, a doença que está sendo tratada com MTX afeta a massa óssea, o que dificulta a distinção entre os efeitos da droga propriamente dita, daqueles da doença de base. Em recente trabalho, Laurindo et al., 2003, desenvolveram um protocolo experimental com coelhos em fase de crescimento, para avaliar os efeitos do tratamento por três meses com MTX, com e sem suplementação de AF, na densidade mineral óssea (DMO) de coelhos saudáveis. Os resultados mostraram que o MTX promoveu a inibição do aumento da DMO em coelhos em crescimento, e que a administração concomitante de AF inibiu este efeito.

Em um estudo realizado *in vitro*, o efeito do MTX sobre cultura de osteoblastos derivadas de humanos foi predominantemente inibidor da proliferação de osteoblastos, mesmo quando empregado em doses baixas (Scheven et al., 1995).

O metabolismo ósseo é influenciado por administrações crônicas de altas doses de MTX, utilizado para tratamentos oncológicos em crianças. O aparecimento de Osteoporose localizada, com severas dores nas extremidades e ocorrência de fraturas espontâneas, compõe a tríade de sintomas da Osteopatia por MTX, inicialmente observada nesta população. A maior parte das fraturas observadas ocorre na tíbia, principalmente na região dos tornozelos. A remissão dos sintomas acontece após a interrupção do tratamento com o MTX. Maenaut et al., 1996, relataram a ocorrência de fraturas semelhantes `aquelas vistas nos casos de Osteopatia por MTX, observadas em crianças tomando altas doses desta droga, em duas mulheres sob uso de MTX em doses baixas, para o tratamento de artrite reumatóide (AR). Da mesma forma, Zonneveld et al., 1996, descreveram esta situação em três mulheres igualmente sob o uso de MTX em doses baixas, para o tratamento da mesma patologia, e, assim como Maenaut e seus colaboradores, observaram que, antes de diagnosticar a ocorrência da Osteopatia, é de fundamental importância determinar os fatores de risco para Osteoporose previamente existentes nesses pacientes, tais como tratamentos prévios com corticosteróides, diagnóstico prévio de Osteoporose, idade, sexo feminino, falta de atividade física, duração, severidade e atividade da doença de base, além de massa óssea baixa.

Ainda com relação ao metabolismo ósseo de pacientes tratados com MTX, Miedany et al., 1998, avaliaram marcadores do metabolismo ósseo em pacientes com AR ativa, bem como o efeito de doses baixas de MTX no turnover ósseo. A terapêutica medicamentosa teve início com uma dose semanal de 10-15 mg. Nenhum paciente recebeu corticosteróides antes ou

após a duração deste estudo. Os autores concluíram que em pacientes com AR o metabolismo ósseo é afetado. Na doença ativa, há uma diminuição da formação óssea, enquanto a reabsorção do osso é aumentada. A terapia com baixas doses de MTX melhorou a reabsorção óssea sugerindo que em pacientes com AR, o MTX pode ter um efeito protetor através do controle da atividade da doença.

Com a intenção de esclarecer o papel do MTX no metabolismo ósseo em pacientes sem doenças sistêmicas que afetem o esqueleto, Patel et al., 2003, realizaram um estudo onde, durante dois anos, 30 pacientes com psoríase e sob tratamento de MTX para tal patologia, foram acompanhados através de exames de densitometria óssea. Os resultados não mostraram alterações na densidade mineral óssea destes pacientes, nem uma maior prevalência de Osteoporose nesses indivíduos, quando comparados a indivíduos da mesma faixa etária.

Num único estudo, Eder & Watzek, 1999, publicaram um relato de caso, sobre a reabilitação oral com implantes de titânio, em uma paciente de 80 anos, com histórico de Osteoporose severa e Poliartrite crônica, cujo tratamento incluiu MTX. A paciente foi reabilitada com sucesso através de uma prótese fixa suportada por seis implantes colocados na região entre os forames mentonianos da mandíbula. Os implantes permaneceram osseointegrados e nas camadas periimplantares não se constatou colonização bacteriana. O acompanhamento radiográfico revelou apenas uma perda óssea um pouco maior do que a geralmente encontrada em pacientes saudáveis, mas isto não causou insucesso no tratamento.

A terapia com corticosteróides (CE) em doenças inflamatórias crônicas promove um rápido alívio dos sintomas e geralmente é associada a outras drogas, freqüentemente ao MTX, no controle dessas doenças. A ação do CE sobre o tecido ósseo tem, sobre este, um impacto importante, e a exposição contínua aos CE leva este tecido a apresentar uma condição semelhante à Osteoporose.

A Osteoporose induzida por CE se tornou um achado clínico importante, que tem como característica principal a redução da massa óssea, ocorrendo por diminuição na formação de osso e aumento de sua reabsorção. Verifica-se, ainda, a diminuição das espessuras das corticais e das trabéculas ósseas medulares. Esta situação predispõe o osso à perda da resistência mecânica e à maior incidência de fraturas (Canalis & Delany, 2002).

Grardel et al., 1994 avaliaram o papel dos CE sobre o tecido ósseo de coelhos tratados com prednisona durante cinco meses, através de densitometrias ósseas, análises histomorfométricas e avaliações mecânicas das vértebras desses animais, constatando uma diferença significativa entre a DMO do grupo tratado comparado ao grupo controle. O perfil histomorfométrico mostrou menor volume ósseo e trabéculas mais finas nos coelhos sob influência da medicação. Os testes mecânicos corroboraram estes achados, com expressiva diminuição da resistência óssea.

Outro modelo de Osteoporose por Corticoterapia foi mostrado por Chavassieux et al., 1997, onde ovelhas idosas foram tratadas com metilprednisona por três meses, e ao final do experimento, mostraram através da análise histomorfométrica, diminuição da formação e aumento da reabsorção óssea.

Os efeitos dos corticosteróides sistêmicos na cicatrização óssea dependem parcialmente do tipo de injúria e da dose da medicação utilizada. Waters et al, 2000, realizaram um interessante estudo submetendo dezoito coelhos fêmeas a osteotomias das ulnas bilateralmente, causando um defeito de 1 mm entre os cotos ósseos. Não houve fixação interna ou externa das fraturas, tendo o rádio servido de guia para a remodelação, e permitindo o suporte do peso do animal. O grupo controle recebeu injeções subcutâneas diárias de solução salina e o grupo tratado com corticosteróide recebeu injeções subcutâneas diárias de prednisona (0,15 mg/kg). As injeções começaram dois meses antes da intervenção cirúrgica e continuaram por mais seis semanas. A dose de prednisona utilizada é conhecida causadora de perda óssea em coelhos e similar à dose para Osteoporose iatrogênica causada por corticosteróides em humanos. Os coelhos foram radiografados semanalmente a partir da segunda semana de pós-operatório. Após o sacrifício, mais radiografias foram realizadas já com os tecidos moles dissecados, avaliando parâmetros específicos, como análise das dimensões e condições dos calos ósseos e diâmetro da ulna no local da osteotomia. Foram obtidas densitometrias ósseas para cada pata, para avaliação da densidade mineral óssea (DMO), além de testes mecânicos através de aplicação de torque nos segmentos afetados. Os autores concluíram que o tratamento crônico com prednisona causou, claramente, a inibição da cicatrização óssea.

Utilizando o mesmo modelo animal e a mesma técnica cirúrgica, em 2002, Luppen et al, avaliaram o efeito da administração crônica de prednisona, numa dosagem de 0,35 mg/kg três vezes por semana. Os coelhos receberam a medicação por seis semanas antes da realização das

osteotomias. Em uma das osteotomias, os coelhos foram tratados com esponjas de colágeno embebidas em proteína morfogenética óssea humana recombinante e na outra não receberam tratamento. A cicatrização foi avaliada de seis a oito semanas após a criação das osteotomias sendo que a medicação foi mantida por este período. A avaliação histológica mostrou que a cicatrização foi inibida pela prednisona e acelerada pela proteína morfogenética óssea.

Friberg, 1994, mostrou um caso de reabilitação oral através de implantes osseointegrados em uma paciente com Osteoporose severa e história de uso crônico de CE para o tratamento de Poliartrite. Cinco implantes foram instalados, inicialmente na maxila, para suportar uma prótese tipo overdenture. Um ano depois, foram instalados mais seis implantes na mandíbula que suportaram uma prótese fixa de doze elementos. Durante o acompanhamento do caso, aproximadamente um ano mais tarde, a overdenture deu lugar a uma prótese fixa de dez elementos na maxila, pois os implantes permaneciam osseointegrados, sem evidências de perda óssea. Anos mais tarde, a paciente apresentou progressão da doença de base, com exacerbação dos sintomas, quando foi então, medicada com MTX por dez meses, período durante o qual sofreu uma fratura de fêmur. Na avaliação odontológica, realizada no ano seguinte, e seis anos após a inserção dos implantes, observou-se que os implantes permaneciam estáveis, sem sinais de perda óssea, e sem sintomatologia.

Os bifosfonatos são medicamentos inibidores da atividade osteoclástica, e são amplamente utilizados no tratamento da Osteoporose. O ácido zoledrônico (ZOL) é um bifosfonato que contém nitrogênio e atua

principalmente como inibidor da reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos. Após a administração endovenosa, o ZOL distribui-se rapidamente pelo tecido ósseo, e tal como os outros bifosfonatos, deposita-se preferencialmente em locais de reabsorção óssea.

Little et al, 2003 avaliaram o efeito do ZOL em um modelo animal de distração osteogênica, utilizando 42 coelhos machos. Na distração osteogênica, com finalidade ortopédica, o osso é cortado e os segmentos são movimentados em direção contrária durante a fase de distração através de um distrator fixado nos cotos ósseos, aparelho que permite o afastamento desses segmentos por ativação mecânica, para que ocorra formação óssea entre os cotos. Após atingir o comprimento desejado, o distrator é travado, promovendo a fixação dos cotos na nova posição durante o período de cicatrização. O modelo escolhido resulta em formação óssea entre os cotos das osteotomias realizadas para a distração, onde se observa osteopenia provocada pela tração. Neste interessante estudo, os coelhos foram submetidos à distração osteogênica na tíbia direita por 14 dias. Foram formados três grupos de catorze animais cada, onde um grupo recebeu solução salina endovenosa por 30 minutos durante a cirurgia, outro recebeu ZOL (0.1mg/kg) via endovenosa por 30 minutos no momento da cirurgia e outro recebeu uma dose extra de ZOL (0.1mg/kg) via endovenosa 2 semanas após, no último dia da ativação do distrator. Os coelhos foram submetidos a análises de densitometria óssea nos segmentos operados e nas tíbias contralaterais. Após o sacrifício, com seis semanas, 30 pares de tíbias foram analisados por tomografia computadorizada e 12 por histomorfometria. Os autores observaram que a administração de ZOL provocou aumento de conteúdo mineral ósseo, de resistência e número de

trabéculas com osteopenia reduzida na área de tração neste modelo de distração.

Jarret et. al., 2006, avaliaram o papel do ZOL no tratamento de pacientes com AR que foram tratados com MTX e receberam ZOL duas vezes, com intervalo de treze semanas. O grupo tratado com ZOL apresentou-se com 61% menos de erosões observadas no exame de ressonância magnética quando comparado ao grupo que recebeu placebo. Os autores concluíram que o ZOL promoveu um benefício na estrutura óssea dos pacientes com AR quando associado ao MTX.

Considerando a escassez de estudos avaliando os efeitos das drogas comumente utilizadas no tratamento de pacientes com doenças inflamatórias crônicas, bem como das drogas protetoras do tecido ósseo na osseointegração de implantes de titânio utilizados na reabilitação oral, desenvolvemos um estudo experimental, a fim de observar as características da cicatrização óssea ao redor de implantes de titânio inseridos em tíbias de em coelhos, sob uso dessas drogas de forma isolada ou associada.

OBJETIVOS

2. Objetivos

- Avaliar a interferência do MTX, associado ou não ao AF, do CE, associado ou não ao MTX, e ao ZOL por um período de 18 semanas sobre o tecido ósseo de coelhos.
- Observar as alterações de massa óssea através da DMO.
- Correlacionar as alterações de DMO aos achados histomorfométricos.
- Observar a interferência das drogas utilizadas na osseointegração dos implantes de titânio inseridos nas tíbias destes animais.

MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e métodos

3.1 Animais

Foram utilizados trinta e oito coelhos machos, da raça *New Zealand White* (NZW), pesando 2.67 ± 0.067 Kg, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os animais foram mantidos em experimentação, em gaiolas individuais, com água e ração *ad libitum*, no Biotério climatizado da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina e estão de acordo com o COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

3.2 Implantes

Foram utilizados trinta e oito implantes Porous de titânio de 3,75 mm de diâmetro por 8,5 mm de comprimento da marca Conexão Sistema de Prótese Ltda.

Fig. 1. Implante dental de titânio utilizado no estudo (Porous- Conexão Sistema de Prótese Ltda).

3.3 Avaliação Ponderal

Os animais foram pesados semanalmente, para o cálculo das dosagens preconizadas na terapia medicamentosa instituída.

3.4 Terapia medicamentosa

Os trinta e oito animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos experimentais.

O grupo Controle (CTL) n=6, recebeu injeções via subcutânea (SC) de solução salina uma vez por semana.

O grupo Metotrexato (MTX) n=6, recebeu injeções via intramuscular (IM) de MTX numa dosagem de 3mg/kg uma vez por semana.

O grupo Metotrexato - Ácido Folínico (MTX-AF) n=6 recebeu injeções via IM de MTX numa dosagem de 3mg/kg uma vez por semana, e após vinte e quatro horas, recebeu, também semanalmente, uma dose de 0,25 mg/ Kg de ácido folínico, por via IM.

O grupo Corticosteróide (CE) n=8 recebeu injeções subcutâneas de prednisona, numa dosagem de 0,35 mg/kg, três vezes por semana.

O grupo Metotrexato – Corticosteróide (MTX-CE) n=6 recebeu injeções subcutâneas de prednisona, numa dosagem de 0,35 mg/kg, três vezes por semana e injeções intramusculares de MTX numa dosagem de 3 mg/kg uma vez por semana.

O grupo Corticosteróide- Ácido Zoledrônico (CE-ZOL) n=6, recebeu injeções subcutâneas de prednisona, numa dosagem de 0,35 mg/kg, três

vezes por semana durante todo o experimento, e uma dose única de ácido zoledrônico (0.1mg/kg) no momento da cirurgia administrado via endovenosa (EV).

3.5 Análise Hematológica

Amostras de sangue foram coletadas antes e após a administração das drogas para realização de hemograma. A primeira coleta se deu antes da administração das drogas, no primeiro dia do experimento. A segunda coleta, após seis semanas, na ocasião da cirurgia de colocação de implantes, e a terceira coleta, com dezoito semanas, no momento do sacrifício. Os exames foram realizados no Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Foram realizadas análises de contagem total e diferencial de leucócitos.

3.6. Densitometria Óssea

A avaliação da densidade mineral óssea foi realizada através de exame de densitometria de dupla emissão de fonte de raios X (DXA), através do densitômetro Hologic QDR 2000, com software especialmente desenvolvido para análise de dados em pequenos animais. Os exames foram realizados no Laboratório de Metabolismo Ósseo da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Foram avaliadas, a coluna na região de L4 e L5 e a tíbia direita. Os resultados da coluna foram obtidos pela média das DMOs obtidas para L4 e L5, e os valores referentes à tíbia foram aferidos considerando sempre a mesma área em todos os animais. Os valores foram expressos em g/cm^2 . A precisão da DXA para a determinação da DMO é avaliada ao medirmos o coeficiente de variação, expresso pelo percentual da média. Por essa razão, cinco tomadas consecutivas da mesma região anatômica da mesma amostra foram realizadas. O coeficiente de variação do densitômetro obtido desta maneira foi de 0,5%.

A primeira análise foi realizada antes da administração das drogas (D1), a segunda (D2) na oitava semana do experimento, e a terceira (D3) na décima-oitava semana.

A Variação da DMO $(_{2-1})$ (Δ DMO $(_{2-1})$) foi observada, na oitava semana, através do cálculo da diferença entre a D2 e a D1, conforme a fórmula abaixo:

$$\Delta \text{ DMO } (_{2-1}) = \text{ DMO}_2 - \text{ DMO}_1$$

Na décima - oitava semana, o resultado foi obtido através do cálculo da Variação da DMO $(_{3-1})$ (Δ DMO $(_{3-1})$), expressada pela diferença entre a D3 e a D1, como demonstrado abaixo:

$$\Delta \text{ DMO } (_{3-1}) = \text{ DMO}_3 - \text{ DMO}_1$$

Expressamos ainda, em valores percentuais, as variações observadas nas duas ocasiões, através da fórmula abaixo:

$$\text{ Percentual de variação} = 100 \times (\text{ DMO final} - \text{ DMO inicial}) / \text{ DMO inicial}.$$

3.7 Procedimento cirúrgico

A cirurgia para a colocação dos implantes foi realizada seis semanas após o início da administração das drogas. Os animais foram anestesiados, via intramuscular, com Xilazina (5mg/Kg) e Ketamina (50mg/Kg), e receberam uma dose única pré-operatória de 0.5 ml do antibiótico Enrofloxacin (Baytril ® 50mg/ml – Bayer) antes do início do procedimento. Após tricotomia e assepsia com álcool iodado, o campo operatório foi isolado com campos cirúrgicos estéreis e descartáveis.

Foi realizada uma incisão cirúrgica de aproximadamente 2 cm na porção proximal da tíbia esquerda, e a tíbia foi exposta após descolamento do periósteo. O leito receptor do implante foi alargado lenta e progressivamente, sob intensa irrigação salina. Todos os implantes foram inseridos apresentando estabilidade primária.

A sutura foi realizada por planos, com fio de sutura tipo mononylon 5.0. Os coelhos foram medicados com 20 gotas de Dipirona Sódica diluídas em um litro de água por dia, durante três dias no período pós-operatório.

Fig. 2. Procedimento cirúrgico para colocação do implante.

A - Incisão da pele após tricotomia e assepsia. B - Descolamento do periósteo e exposição da tíbia. C - Confeção do leito cirúrgico com abundante irrigação salina. D - Leito cirúrgico pronto para receber o implante. E - Implante inserido na tíbia do coelho. F - Sutura em planos da musculatura e periósteo e da pele.

3.8 Obtenção das peças

Na 18ª semana do experimento, os animais foram anestesiados e sacrificados através de overdose de anestésico aplicada via endovenosa, as tíbias foram dissecadas e, com um disco diamantado, foram cortados os segmentos ósseos contendo os implantes. Da tíbia contralateral, coletamos um segmento de aproximadamente 10 mm de comprimento, da região previamente avaliada através da DXA.

3.9 Processamento histológico

Os espécimes foram fixados em formol 10% por duas semanas, lavados por 24 horas em água corrente e desidratados por séries ascendentes de álcool, ficando por dois dias em álcool a 40%, dois dias em álcool a 70%, dois dias em álcool a 95%, e quatro dias em álcool 100%, sendo esta solução trocada no meio deste período. Após esta desidratação, as peças foram imersas em xilol por quatro dias, sendo esta solução renovada no meio deste período. Para a inclusão, as peças ficaram inicialmente por dois dias em solução resinosa composta de 85% de Metilmetacrilato (MMA), e 15% de Dibutilfitalato (DIBUT). Após este período, as peças ficaram imersas por mais dois dias em nova solução composta de 85% de MMA, e 15% de DIBUT e acrescida de 1 grama de peróxido de benzoíla para cada 100 ml de solução. A solução para inclusão foi composta de 85% de MMA, e 15% de DIBUT e acrescida de 3 gramas de peróxido de benzoíla para cada 100 ml de solução. Os vidros utilizados na inclusão foram

armazenados protegidos da luz durante o período de polimerização da resina. A técnica empregada permitiu a produção de secções não descalcificadas de tecido ósseo (Lima et al, 2003).

Concluída a polimerização, os vidros foram quebrados e os blocos de resina com as tíbias incluídas foram cortados com disco de diamante de 0,3 mm numa velocidade de corte de 6,4 m/min, numa espessura de 500 μm .

Fig. 3. Corte do bloco de resina com disco diamantado

Os cortes então foram lixados com uma lixa de granulação de 9 μm , e lavados em cuba ultrassônica com água destilada por 5 minutos, juntamente com as placas de acetato, onde foram colados.

Os cortes foram desgastados e polidos utilizando-se uma sequência de lixas até que chegassem a espessuras de 80 a 100 μm , aferidas com um paquímetro digital. A coloração utilizada foi o azul de toluidina.

3.10 Análise Histomorfométrica

A Análise Histomorfométrica foi realizada nas tíbias direitas, sem implantes, através da aferição em micrômetros (μm) da espessura da cortical óssea. As lâminas foram fotografadas ao microscópio com aumento de uma lente objetiva de 4 X , sendo obtidas para cada lâmina seis fotos, mapeando todo o perímetro ósseo. As medidas foram tomadas a intervalos de 30 μm , e os resultados foram obtidos pelo cálculo da média das espessuras tomadas. A análise foi realizada através do programa Image Pro-Plus 6, software especialmente desenvolvido para análises de histomorfometria.

Para obtenção dos valores do contato direto entre o osso e o implante, as lâminas das tíbias esquerdas, contendo os implantes, foram fotografadas ao microscópio, em aumento de 4 X, de forma que todo o perímetro do implante foi avaliado. Foram tiradas 9 fotografias por lâmina . As análises foram realizadas através do software Axio-Vision 3.

Para obtermos o percentual de contato entre osso e implante, medimos o perímetro total do implante (PTI) e posteriormente, aferimos as regiões onde observamos contato entre osso e implante (COI). O cálculo do percentual de contato foi obtido através da fórmula abaixo:

$$\% \text{ COI} = (\text{COI} / \text{PTI}) \times 100$$

A análise quantitativa de tecido ósseo foi realizada através de fotografias panorâmicas das lâminas contendo os implantes, e posteriormente estas imagens foram aferidas com o auxílio do software Image Pró- Plus 6. A área

total (AT), contendo a tíbia e o implante, foi calculada pelo contorno externo do conjunto, e expressa em μm^2 . A porção óssea (PO) foi selecionada e aferida através de um recurso do programa que permitia a mensuração apenas desta área, evidenciada pelo corante utilizado.

O percentual de tecido ósseo (%TO) foi calculado de acordo com a fórmula abaixo:

$$\%TO = (PO / AT) \times 100$$

O processamento histológico e análise histomorfométrica foram realizados no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Estomatologia da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia da USP.

3.11 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os dados foram analisados por teste “t” de Student ou análise de variância complementada pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls e Turkey quando de distribuição normal; os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Mann-Whitney. As análises intra-grupo, foram realizadas pelo teste de Friedman.

O nível de significância considerado foi o de 0,05.

Fig. 4. Cronograma de execução do experimento evidenciando os períodos em que foram realizadas as densitometrias ósseas (D1, D2, D3) e a cirurgia para a colocação dos implantes.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1 Avaliação Ponderal

A figura 5 ilustra a alteração ponderal dos grupos estudados.

Todos os animais inicialmente apresentavam pesos semelhantes, e ao longo do estudo ganharam peso igualmente. Não foram observados efeitos adversos gastrointestinais, como vômito e diarreia durante as dezoito semanas do experimento.

Fig. 5. Variação do peso (Kg) dos coelhos durante 18 semanas de tratamento com solução salina, MTX, MTX-AF, CE, CE-MTX, e CE-ZOL (ZOL- dose única na 6ª semana).

4.2 Contagem total e diferencial de leucócitos

A tabela 1 mostra os resultados obtidos na avaliação hematológica dos animais, nos três momentos da coleta de sangue. Os grupos foram comparados antes e após os tratamentos, para se avaliar o efeito dos mesmos no hemograma.

O grupo CTL manteve o número total de células brancas inalterado e não houve alteração significativa de nenhuma linhagem leucocitária.

O grupo tratado com MTX apresentou uma queda significativa no número de leucócitos totais ($p=0,04$) que, entretanto, não atingiu significância na contagem diferencial.

O grupo MTX-AF apresentou o número de leucócitos estável ao longo do experimento.

O grupo CE apresentou diminuição significativa na contagem de células linfo-mononucleares MN ($p=0,002$), não tendo tido alterações no número de células polimorfonucleares (PMN) e na contagem total.

Os tratamentos: CE-MTX e CE-ZOL não alteraram os valores de hemograma durante o período do estudo.

Tabela 1- Contagem total e diferencial de leucócitos. A contagem total inicial está descrita como L1, e as diferenciais como PMN1 e MN1, e assim sucessivamente para as contagens após 6 semanas (L2, PMN2 e MN2) e 18 semanas (L3, PMN3 e MN3) nos grupos tratados com salina, MTX, MTX-AF, CE, CE-MTX, e CE-ZOL.

	L1	PMN1	MN1	L2	PMN2	MN2	L3	PMN3	MN3
CTL	1118±1587	3922±558	7260±1400	13062±1024	3575±147	9487±877	8500±937	2672±631	5827±354
MTX	9341±975	3516±513	5825±774	9675±1223	3922±1015	5736±300	7800±1122*	2924±577	4870±768
MTX-AF	8758±941	2351±320	6407±753	9650±1287	2292±637	7357±869	8850±797	1957±261	6893±619
CE	10810±1005	2705±424	8106±815	7711±465	2721±307	4989±260*	8066±521	4004±349	4061±1090*
CE-MTX	10650±1717	2648±637	8009±1220	9108±2367	3286±663	5821±1767	6991±1249	2383±507	4390±788
CE-ZOL	11440±850	6242±1079	7707±1590	1048±836	4825±486	5582±761	9133±314	4546±430	4587±450

Os resultados estão expressos com média ± e.p.m

*p≤ 0,05 em relação ao início do experimento, células sombreadas

4.3 Densitometria óssea obtida de L4 e L5

Na tabela 2 estão apresentados os resultados da avaliação da densidade mineral óssea dos animais em 3 momentos distintos: inicial, após 8 semanas e após 18 semanas.

Todos os grupos partiram de uma DMO 1 inicial semelhante. Os tratamentos MTX e MTX-AF não promoveram alterações de DMO durante todo o curso do tratamento.

Após 8 semanas os valores de DMO dos grupos CE (DMO2= 0,2620 ± 0,0124) e CE-MTX (DMO2=0,2836 ± 0,069) já se apresentavam

significativamente reduzidos em relação aos controles ($DMO2 = 0,3112 \pm 0,098$), ($p=0,03$ e $p= 0,045$ respectivamente). A adição do MTX ao tratamento com CE não promoveu redução adicional de DMO durante todas as 18 semanas.

Após 18 semanas, os valores de DMO3 dos grupos CE ($DMO3= 0,2636 \pm 0,0131$) e CE-MTX ($DMO= 0,2805 \pm 0,0051$) permaneceram inferiores em relação ao CTL ($DMO= 0,3237 \pm 0,0083$) ($p= 0,004$ e $p=0,04$ respectivamente). A adição de ácido zoledrônico ao grupo de CE aumentou a DMO após 18 semanas ($DMO= 0,3336 \pm 0,011$, $p= 0,015$ vs CE).

Tabela 2 - Valores da DMO obtida de L4 e L5 inicialmente (D1), após 8 semanas (D2), e após 18 semanas (D3). As variações das DMOs após 8 semanas ($\Delta DMO 2-1$) e 18 semanas ($\Delta DMO 3-1$) são apresentadas

	D1 inicial	D2 8 sem	D3 18 sem	$\Delta D2-D1$ 8 sem	$\Delta D3-D1$ 18 sem
CTL(6)	0,2685 $\pm$ 0,0076	0,3112 $\pm$ 0,0098	0,3237 $\pm$ 0,0083	0,0327 $\pm$ 0,0073	0,0551 $\pm$ 0,0093
MTX(6)	0,2744 $\pm$ 0,011	0,3050 $\pm$ 0,0123	0,3094 $\pm$ 0,0177	0,0306 $\pm$ 0,0006	0,03498 $\pm$ 0,015
MTX-AF(6)	0,2467 $\pm$ 0,0085	0,3003 $\pm$ 0,0115	0,3076 $\pm$ 0,0111	0,0446 $\pm$ 0,0114	0,0608 $\pm$ 0,0080
CE(8)	0,2676 $\pm$ 0,0105	0,2620 $\pm$ 0,0124*	0,2636 $\pm$ 0,0131*	-0,0080 $\pm$ 0,0078*	-0,0039 $\pm$ 0,0117*
CE-MTX(6)	0,2838 $\pm$ 0,0109	0,2836 $\pm$ 0,0069*	0,02805 $\pm$ 0,0051*	-0,0034 $\pm$ 0,0100*	-0,0032 $\pm$ 0,0118*
CE-ZOL(6)	0,2906 $\pm$ 0,0058	0,2860 $\pm$ 0,0075	0,3336 $\pm$ 0,0111#	-0,0046 $\pm$ 0,0042*	0,043 $\pm$ 0,013#

p<0,05 em relação ao controle, células em cinza

p<0,05 em relação ao CE

Em conjunto os resultados apresentados na figura 6 mostram que, após 8 semanas, houve ganho de massa óssea nos grupos CTL ($\Delta \text{DMO}_{2-1} = 0,0327 \pm 0,0073$; 12,18 %), MTX ($\Delta \text{DMO}_{2-1} = 0,0306 \pm 0,0006$; 11,16 %), MTX-AF ($\Delta \text{DMO}_{2-1} = 0,0446 \pm 0,0114$; 18,09%), enquanto que os grupos CE ($\Delta \text{DMO}_{2-1} = -0,008 \pm 0,0078$; -2,98 %), CE-MTX ($\Delta \text{DMO}_{2-1} = -0,0034 \pm 0,01$; -1,21 %) e CE-ZOL ($\Delta \text{DMO}_{2-1} = -0,0046 \pm 0,0042$; -1,58%) apresentaram perda de massa óssea. Os dados mostram uma diferença significativa entre os grupos CTL e os grupos CE ($p = 0,012$), MTX-CE ($p = 0,037$), e CE-ZOL ($p = 0,03$).

* $p \leq 0,05$ em relação ao controle

Fig. 6. Variação de DMO (ΔDMO_{2-1}) de L4-L5 após 8 semanas de tratamento com salina, MTX, CE, AF e associações. O ZOL foi administrado em dose única 2 semanas antes desta análise.

Na figura 7 estão apresentados os valores de DMO após 18 semanas de tratamento. A variação da DMO em relação ao início do experimento mostrou que os animais do grupo controle ganharam massa óssea no período ($\Delta \text{DMO3-1} = 0,0551 \pm 0,0093$; 20,55%). Igualmente, o tratamento com MTX ($\Delta \text{DMO3-1} = 0,03498 \pm 0,015$; 12,74%), MTX-AF ($\Delta \text{DMO3-1} = 0,0608 \pm 0,008$; 24,65%) e CE-ZOL ($\Delta \text{DMO3-1} = 0,043 \pm 0,013$; 14,80%) não prejudicaram o ganho de massa óssea.

Os animais tratados apenas com CE ($\Delta \text{DMO3-1} = -0,0039 \pm 0,0117$; -1,48%) ou em associação com MTX ($\Delta \text{DMO3-1} = -0,00342 \pm 0,0118$; -1,14%) apresentaram perda de massa óssea, também nessa fase do experimento. Os níveis de significância em relação ao grupo controle são: CE ($p = 0,009$) e para o MTX-CE ($p = 0,007$).

A adição de ZOL ao tratamento com CE promoveu um ganho de massa óssea aos animais tratados somente com CE ($p = 0,02$). Salienta-se que os valores de DMO não são distinguíveis dos obtidos em animais controles. A administração de ZOL ocorreu após 6 semanas do início do tratamento, quando já estava estabelecida a redução de DMO em função do CE.

* $p \leq 0,05$ em relação ao controle

$p \leq 0,05$ em relação ao CE

Fig. 7. Variação da DMO de L4-L5 (ΔDMO_{3-1}) após 18 semanas de tratamento com salina, MTX, CE, AF e associações. ZOL administrado em dose única na 6ª semana.

4.4 Densitometria óssea das tíbias

Na tabela 3 estão apresentados os valores da densitometria óssea das tíbias nos 3 momentos avaliados. Todos os grupos partiram de uma DMO 1-inicial semelhante.

Após 8 semanas os valores de DMO dos grupos CE ($DMO_2 = 0,3576 \pm 0,004$) e CE-MTX ($DMO_2 = 0,3622 \pm 0,012$) se mostraram diferentes ($p = 0,001$ e $p = 0,04$ respectivamente) em relação ao CTL ($DMO_2 = 0,4078 \pm 0,011$). A adição de MTX ao CE não alterou a DMO frente ao grupo tratado só com CE.

O MTX (DMO 2= 0, 3858±0, 014) e MTX-AF (DMO 2= 0, 4022±0, 009) foram semelhantes entre si e não distinguíveis dos CTL durante todo o decorrer do experimento.

Igualmente aos achados de L4-L5, na 18ª semana, a DMO das tíbias se manteve reduzida nos animais tratados com CE e CE-MTX (p=0,01 e p= 0,04 vs controle, respectivamente). A adição de ZOL promoveu um aumento na DMO (Δ DMO= 0,3960±0,011) em relação aos animais tratados somente com CE (p=0,016) e com CE- MTX (p= 0,034).

Tabela 3 - Valores das DMOs das tíbias, inicial (D1), após 8 semanas (D2), e após 18 semanas (D3). As variações das DMOs após 8 semanas (Δ DMO₂₋₁) e 18 semanas (Δ DMO₃₋₁) são também apresentadas.

	D1	D2	D3	Δ D2-D1	Δ D3-D1
CTL	0,3708±0,012	0,4078±0,011	0,4117±0,012	0,0333±0,011	0,04086±0,011
MTX	0,3853±0,008	0,3858±0,014	0,4058±0,015	0,0005±0,007	0,0205±0,009
MTX-AF	0,3867±0,011	0,4022±0,009	0,4178±0,009	0,0351±0,0005	0,0507±0,008
CE	0,3764±0,008	0,3576±0,004*	0,3580±0,004*	-0,0187±0,006*	-0,0183±0,010*
CE-MTX	0,3867±0,011	0,3622±0,012*	0,3567±0,011*	-0,024±0,010*	-0,0030±0,012*
CE-ZOL	0,3689±0,009	0,3620±0,010	0,3960±0,011#	-0,0069±0,004*	0,027±0,003#

* p<0,05 por comparação aos controles

p<0,05 em comparação ao grupo com corticóide CE

Na figura 8 estão expressos os dados da variação entre a DMO1 inicial e a DMO2 realizada oito semanas após o início do experimento. Observa-se ganho de massa óssea nos grupos CTL ($\Delta \text{DMO}_{3-1} = 0,033 \pm 0,011$; 8,99%), MTX ($\Delta \text{DMO}_{3-1} = 0,0005 \pm 0,004$; 0,14%), MTX-AF ($\Delta \text{DMO}_{3-1} = 0,035 \pm 0,005$; 9,55%). Os grupos tratados com CE ($\Delta \text{DMO}_{3-1} = -0,018 \pm 0,006$; -4,99%), CE-MTX ($\Delta \text{DMO}_{3-1} = -0,024 \pm 0,011$; -4,86%) e CE-ZOL ($\Delta \text{DMO}_{2-1} = -0,006 \pm 0,004$; -1,88%) apresentaram perda de massa óssea.

* $p \leq 0,05$ em relação ao controle

Fig. 8. Variação da DMO (DMO_{2-1}) da tíbia após 8 semanas de tratamento com salina, MTX, CE, AF e associações. O ZOL foi administrado em dose única, 2 semanas antes desta análise.

Na figura 9 estão expressas as alterações entre as DMO inicial e final. Observa-se aumento de massa óssea nos grupos CTL ($DMO_{3-1} = 0,04086 \pm 0,011$; 11,01%), MTX ($DMO_{3-1} = 0,0205 \pm 0,009$; 5,32%), MTX-AF ($DMO_{3-1} = 0,0507 \pm 0,008$; 13,80%). Os grupos de tratamento (CE e CE-MTX) mantêm a mesma perda de massa óssea já observada na oitava semana (CE $p = 0,001$, MTX-CE $p = 0,006$ vs controle). A adição de ZOL na sexta semana foi suficiente para promover uma reversão na perda de massa óssea verificada no grupo CE somente na 18ª semana (CE-ZOL $DMO_{3-1} = 0,027 \pm 0,004$; 7,34%), ganho esse semelhante ao apresentado pelo grupo CTL.

* $p \leq 0,05$ em relação ao controle

$p \leq 0,05$ em relação ao CE

Fig. 9. Variação da DMO (ΔDMO_{3-1}) da tíbia após 18 semanas de tratamento com salina, MTX, CE, AF e associações. ZOL administrado em dose única na 6ª semana.

4.5 Análise Histomorfométrica

4.5.1 Espessura das corticais das tíbias

Na tabela 4 estão apresentadas as medidas de espessura da porção cortical das tíbias. Na figura 10 painel A está representada uma tíbia no aumento de 4X de um animal controle e em B, a tíbia de um animal tratado com CE, onde podemos exemplificar (setas) os valores inferiores obtidos nos grupos tratados com CE.

Nos animais controle esses valores são de $133,08 \pm 2,36 \mu\text{m}$. Os tratamentos com MTX sozinho ou associado ao AF não altera a espessura das tíbias.

O tratamento com CE reduz a espessura do osso cortical ($98,81 \pm 2,28 \mu\text{m}$; $p=0,003$ vs. CTL), bem como a associação de CE-MTX ($96,41 \pm 3,12 \mu\text{m}$; $p= 0,006$ vs. CTL). O grupo CE-ZOL ($122,0 \pm 1,87 \mu\text{m}$) apresentou maior espessura cortical que os grupos CE ($p= 0,001$) e CE-MTX ($p= 0,002$), embora não tenha atingido os valores observados nos animais controle ($p=0,045$ vs CTL).

Tabela 4 - Espessura das corticais das tíbias (μm) obtidas através de análise histomorfométrica após 18 semanas do início dos tratamentos com salina, MTX, MTX-AF, CE, CE-MTX e CE-ZOL.

	CTL	MTX	MTX-AF	CE	CE-MTX	CE-ZOL
	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=8)	(n=6)	(n=6)
Espessura	133,08 $\pm$ 2,3	126,24 $\pm$ 2,4	131,68 $\pm$ 2,8	98,81 $\pm$ 2,28*	96,41 $\pm$ 3,1*	122,00 $\pm$ 1,87*#
Cortical (μm)						

* $p \leq 0,05$ em relação ao CTL

$p \leq 0,05$ em relação ao CE

Fig. 10. Painel A- Medida realizada referente à espessura (μm) do osso cortical da tíbia de um animal do grupo controle. Painel B- Espessura (μm) da tíbia de um animal submetido a tratamento com CE.

4.5.2 Percentual de tecido ósseo presente em relação ao perímetro total da lâmina

Na figura 11 está representada a lâmina de um fragmento ósseo contendo o implante. O tecido ósseo corado em azul foi quantificado para determinação de percentual de osso presente na área total da lâmina pelo programa Image Pro-plus 6.

Nesta análise observamos uma menor quantidade de tecido ósseo nos grupos que foram tratados com CE apenas ou em associação ao MTX e ao ZOL (tabela 5) quando comparados ao grupo controle.

Apesar do CE-ZOL não ter obtido valores semelhantes aos CTL, o grupo apresentou um ganho de tecido ósseo quando comparado ao CE ($p=0,008$).

Tabela 5 - Percentual de tecido ósseo medido na tíbia com o implante, em relação ao perímetro da área total, nos animais tratados com salina, MTX, MTX-AF, CE, CE-MTX, e CE-ZOL durante 18 semanas (ZOL- dose única).

	CTL (n=6)	MTX (n=6)	MTX-AF (n=6)	CE (n=8)	CE-MTX (n=6)	CE-ZOL (n=6)
% de tecido ósseo	33,16±1,29	30,13±1,04	30,60±3,15	24,40±1,51*	25,65±1,63*	30,44±1,42*#

*p≤ 0,05 em relação ao CTL

#p≤0,05 em relação ao CE

Fig. 11. Tíbia de animal controle contendo o implante. O tecido ósseo está corado em azul, e foi quantificado em μm^2 para a determinação de área de tecido ósseo

4.5.3 Percentual de contato osso-implante

Esta análise visou verificar a osseointegração, expressa através do contato direto entre osso e implante medido em μm em todo o perímetro do implante. Nesta análise observamos que os grupos tratados com MTX e MTX-AF apresentaram índices de contato entre osso e implante semelhantes ao grupo CTL (tabela 6 e figuras 12 e 13)

Observamos uma diminuição do percentual de contato entre osso e implante no grupo tratado com CE. O grupo tratado com CE-MTX embora semelhante ao CE não atingiu os níveis de significância. A adição de ZOL elevou o percentual de osseointegração, sendo significativamente diferente dos grupos CE ($p=0,014$) e CE-MTX ($p=0,03$) e se assemelhando ao CTL.

Tabela 6 - Percentual de contato entre osso e implante nos grupos tratados com salina, MTX, MTX-AF, CE, CE-MTX, e CE-ZOL. A análise histomorfométrica foi realizada 12 semanas após a inserção do implante.

	CTL (n=6)	MTX (n=6)	MTX-AF (n=6)	CE (n=8)	CE-MTX (n=6)	CE-ZOL (n=6)
% de contato						
osso-implante	42,40 $\pm$ 4,38	35,09 $\pm$ 3,57	35,92 $\pm$ 3,20	25,98 $\pm$ 2,35*	33,27 $\pm$ 4,06	38,95 $\pm$ 4,24#

* $p \leq 0,05$ em relação ao CTL

$p \leq 0,05$ em relação ao CE e CE-MTX

Fig. 12 . O painel A mostra um Implante inserido na tíbia de um coelho do grupo controle (aumento de 4X). Os painéis B e C mostram a mesma situação num aumento de 40X. O contato osso-implante está indicado com a seta branca; áreas sem contato osso-implante indicadas com setas vermelhas.

Fig. 13. Percentual de contato osso – implante, obtido por análise histomorfométrica em grupos de 6-8 animais tratados com salina, MTX, MTX-AF, CE, CE-MTX e CE-ZOL durante 18 semanas (ZOL- dose única, no momento da cirurgia para colocação do implante). O período de cicatrização intra-óssea dos implantes foi de 12 semanas.

DISCUSSÃO

5. Discussão

Nosso trabalho teve como objetivo esclarecer o papel de drogas comumente utilizadas para o tratamento de doenças inflamatórias, sobre a osseointegração dos implantes de titânio utilizados na reabilitação oral de dentes perdidos.

A administração endovenosa de CE é seguida por linfopenia, devido à migração de linfócitos do sangue periférico e a sua redistribuição em outros tecidos (Van den Broek et al., 1983). Em coelhos, a administração de CE provoca alterações nas contagens totais e diferenciais de leucócitos e estas alterações provavelmente estão relacionadas à via de administração e à dose utilizada. No nosso experimento, não observamos alterações na contagem total de leucócitos, e constatamos apenas uma diminuição na contagem de MN observada no sangue dos coelhos do grupo tratado apenas com CE, que provavelmente ocorreu devido à essa redistribuição de linfócitos, de acordo com Toft et al., 1992 ; entretanto, esta alteração não foi significativa nos demais grupos que foram tratados com CE- MTX e CE-ZOL, apesar de todos apresentarem diminuição na contagem de linfócitos. Provavelmente isto ocorreu porque a dose utilizada em nosso estudo não foi suficiente para provocar as alterações esperadas pelo tratamento com CE em coelhos, sendo suficiente apenas para apontar uma tendência, sendo constatada no

grupo tratado apenas com CE. Provavelmente, numa amostra maior, e em doses mais altas de CE, estes resultados estariam mais homogêneos.

Para que o efeito das drogas pudesse ser realmente observado, entendemos que foi de fundamental importância observar a influência destas drogas sobre o tecido ósseo, independentemente do procedimento cirúrgico proposto neste estudo.

A avaliação do tecido ósseo através de exames de DXA é considerada uma excelente abordagem para a mensuração da DMO *in vivo*, e a utilizamos para acompanhar a variação de DMO observada em nossos grupos experimentais.

A idade dos animais pode interferir na aquisição de massa óssea detectada por exames de DXA, e em coelhos mais jovens, o MTX pode ter um efeito negativo, como observado em estudos previamente conduzidos (Laurindo et al., 2003), onde os resultados mostraram que o MTX promoveu a inibição do aumento de DMO em coelhos em crescimento, e este efeito foi suprimido pela administração concomitante de AF. Ainda em coelhos em fase de crescimento, Moell e Garwicz, 1995, mostraram que altas doses de MTX provocaram a inibição do crescimento destes animais, sendo este efeito também suprimido pela administração de AF. Estes dados estão de acordo com o observado em crianças que desenvolvem Osteopatia por administração de altas doses de MTX.

Da mesma forma, Scheven et al, 1995, mostraram que o MTX inibiu a proliferação de células osteoblasto-like derivadas de amostras de osso trabecular humano, porém vale observar que, neste estudo, o efeito inibitório

do MTX sob a proliferação dos osteoblastos mostrou-se dose-dependente, e que as várias doses utilizadas foram todas mais altas do que aquelas encontradas no soro e no líquido sinovial de pacientes sob uso de MTX. Em semelhante trabalho *in vitro* realizado em osso trabecular de ratos, May et al, 1996, utilizando doses semelhantes às encontradas no soro, no líquido sinovial e no tecido ósseo de pacientes sob o uso de MTX, mostraram diminuição na função dos osteoblastos, porém, as culturas foram expostas a estas concentrações da droga de maneira contínua, diferentemente do que acontece nas administrações de MTX em humanos, que provocam picos semanais, conforme os intervalos de administração.

Nosso trabalho, assim como outro estudo conduzido por May et al, 1994, não mostrou significância entre a DMO do grupo CTL e a DMO do grupo MTX, em nenhum dos parâmetros utilizados, o que se confirmou nas nossas avaliações de histomorfometria óssea da espessura da cortical na tíbia não operada, e da quantidade óssea presente na região onde o implante foi inserido. Além disso, ao avaliarmos a ação do MTX sobre a cicatrização óssea ao redor dos implantes inseridos, mais uma vez apontamos para a mesma direção, onde o MTX não produziu efeitos deletérios sob o osso e seu potencial de regeneração. May e seus colaboradores ao realizarem a análise histomorfométrica, também não encontraram alterações na espessura cortical analisada, e mostraram significância apenas em osso trabecular. Possivelmente isso se deve ao fato que o MTX não foi capaz de produzir efeito sobre o osso cortical.

Ainda sobre o MTX, é muito importante salientar que os efeitos da droga sobre o tecido ósseo devem ser separados dos efeitos das doenças inflamatórias sobre o mesmo, pois como estes pacientes estão expostos a situações que podem levar à osteopenia, como uso concomitante de CE, imobilidade, alterações hormonais e evolução da doença de base. Também devemos observar que o MTX, como observado por Miedany et al 1998, tem um efeito benéfico sobre a reabsorção óssea, em pacientes com AR ativa, sugerindo um efeito protetor desta droga sobre o tecido ósseo através do controle da doença inflamatória.

Ao avaliar apenas o efeito do MTX na DMO de pacientes sem doenças conhecidamente causadoras de perda óssea, Patel e al., 2003, não observaram alterações significativas, nem maior ocorrência de Osteoporose nesses indivíduos, o que vai de acordo com nossos resultados.

No que pudemos observar a respeito do comportamento da osseointegração de implantes de titânio em coelhos sob uso de MTX, consideramos que o tratamento de reabilitação com implantes pode ser perfeitamente conduzido sob a influência desta droga. Corroborando nossos achados, a literatura aponta a reabilitação com implantes osseointegrados em dois pacientes sob uso de MTX, onde esta droga não interferiu de forma negativa na osseointegração e na manutenção dos implantes utilizados (Eder & Watzek, 1999; Friberg, 1999).

Nossos resultados mostraram um efeito negativo da administração de CE sob o metabolismo ósseo, expressado pela diminuição tanto dos valores de DMO final quanto na variação da DMO obtida após 8 e 18 semanas nas DXAs realizadas na coluna e na tíbia dos animais do grupo CE e do grupo CE-MTX. A análise histomorfométrica reforçou estes dados, uma vez que houve significativa diminuição da espessura das corticais das tíbias e também significativa redução na quantificação de tecido ósseo presente na região do implante nos animais destes grupos. Estes resultados já eram esperados, uma vez que a ação deletéria do CE já está bem estabelecida (Pereira et al., 2001)

Pacientes com Osteoporose causada por administração de CE apresentam perda de DMO após poucos meses de tratamento, aumentando o risco de fraturas em coluna e quadril (Canalis & Delani, 2002, Bijlsma et al., 2002); o mesmo foi observado em ovelhas tratadas com CE por três meses (Chavassieux et al., 1997) Nosso estudo mostrou perda de massa óssea após oito semanas de administração do CE, através dos resultados obtidos na ocasião da D2.

Os grupos CE e CE-MTX sofreram uma significativa perda de massa óssea sistêmica que já era esperada, conforme resultados apresentados por Waters et al. (2000) e Luppen et al. (2002). Nesses estudos, coelhos tratados com a mesma dose de CE (1,05 mg/Kg/semana), mostraram diminuição do potencial de cicatrização óssea após fraturas. A mesma situação foi observada por Keller et al, 2004, com doses mais altas (7,5 mg/Kg/dia), que levaram o osso a uma condição semelhante à Osteoporose. No grupo CE-

MTX, a perda óssea ocorrida deve ser atribuída à administração de CE, uma vez que a administração de MTX separadamente não provocou a diminuição da DMO comparado ao grupo CTL.

O aumento de peso dos coelhos durante o estudo foi maior nas primeiras semanas, o que pode sugerir que os coelhos ainda apresentavam algum crescimento, mas se estabilizou após a oitava semana, quando então, pudemos considerá-los adultos. Isto pode explicar o aumento de DMO observada nos grupos CTL, MTX, MTX-AF e reforça a ação deletéria do CE, já que menores valores de DMO foram vistos nos grupos CE e CE-MTX no final do experimento.

Assim como nosso trabalho, Keler et al 2004, mostram que a osseointegração de implantes de titânio pode ser afetada pela exposição ao CE, entretanto, isto não se torna uma contra –indicação absoluta para o tratamento com implantes, uma vez que outros estudos clínicos sugerem que em condições semelhantes à Osteoporose, a osseointegração dos implantes de titânio não foi afetada, pois esta condição pode se manifestar de modo diferente na mandíbula e na maxila, da que apresenta em outras regiões do esqueleto (Steiner & Ramp, 1990; Fujimoto et al., 1998; Mori et al., 1997). O mesmo foi observado por Zarb & Schmidt (1994), que pesquisando a influência do decréscimo da massa óssea sistêmica sobre o processo de osseointegração de implantes dentais, concluíram que esta condição não contra-indica a reabilitação oral com implantes, assim como Starck e Epiker

(1995), que consideram que a Osteoporose não influencia a cicatrização dos implantes inseridos na maxila e na mandíbula.

Corroborando estes fatos, Amorim et al, 2006, comparando parâmetros de qualidade do osso mandibular a parâmetros de DMO encontrados em mulheres com Osteoporose, mostrou que a Osteoporose sistêmica pode não estar associada à presença de Osteoporose no complexo maxilo-mandibular, e que esta condição não é uma contra-indicação para o tratamento através de implantes osseointegrados.

Baxter & Fattore (1993), sugerem que o tratamento da Osteoporose sistêmica pode beneficiar também o prognóstico em longo prazo dos implantes. Os bifosfonatos são amplamente utilizados no tratamento da Osteoporose, e representam uma importante solução terapêutica para o controle da evolução desta condição sistêmica. No nosso estudo, observamos que o ZOL, um bifosfonato potente, apresentou uma ação benéfica sobre o tecido ósseo exposto à corticoterapia no grupo estudado, sendo que sua administração foi capaz de reverter o efeito deletério do CE sobre o tecido ósseo. O grupo tratado com CE e que recebeu a infusão do ZOL no momento da cirurgia, vinha se apresentando de forma semelhante aos grupos que receberam CE e CE-MTX até a oitava semana, mostrando a ação do CE sobre o tecido ósseo, através da perda de DMO. Já na décima-oitava semana do estudo, esta situação havia se revertido, sendo que a variação de DMO que estava negativa (perda de DMO) tornou-se positiva, representando a recuperação da DMO e de tecido ósseo, observada nos parâmetros de histomorfometria analisados. Da mesma forma, observamos

que o percentual de osseointegração alcançado pelo grupo que recebeu ZOL foi significativamente maior que aquele alcançado pelo grupo que estava recebendo apenas CE, mesmo tendo o grupo CE-ZOL tomado CE por 18 semanas, como os demais grupos tratados com CE. Esta reversão dos parâmetros observados pela DMO e constatados pela análise histomorfométrica se deu devido a uma dose única de ZOL, administrada 6 semanas após o início da terapia com CE, quando os coelhos já apresentavam perda de massa óssea, e foi eficiente apesar da continuidade do tratamento com CE até o final do experimento. Esta resposta torna a terapia com ZOL uma importante abordagem terapêutica, uma vez que os pacientes que recebemos para o tratamento com implantes muitas vezes já chegam com o diagnóstico de Osteoporose bem estabelecido.

Esta abordagem deve ser também considerada para a preservação da osseointegração dos implantes, uma vez que o sucesso deste tratamento está relacionado à contínua remodelação do tecido ósseo, e alterações sistêmicas podem ter um papel fundamental sobre este aspecto (Davies, 2000; Duarte et al., 2001; Beikler et al, 2003; Van Steenberghe et al, 2003; Sakakura et al, 2006).

CONCLUSÕES

2. Conclusões

- A terapia com Corticosteróides teve uma ação deletéria sobre o tecido ósseo, alterando as medidas de densidade mineral óssea, diminuindo a espessura da cortical das tíbias e diminuindo a quantidade de tecido ósseo na região adjacente ao implante.
- A terapia com Metotrexato não alterou estes parâmetros, isoladamente ou associada ao Ácido Folínico.
- A adição de Metotrexato ao Corticosteróide não provocou perda adicional de tecido ósseo.
- A terapia com Ácido Zoledrônico promoveu a reversão dos efeitos deletérios do Corticosteróide sobre o tecido ósseo.
- A osseointegração dos implantes de titânio não foi alterada por nenhum dos tratamentos, salvo pelo tratamento com Corticosteróide, onde os índices de contato entre osso e implante foram reduzidos.
- A terapia com Ácido Zoledrônico permitiu que os índices de contato entre osso e implante fossem semelhantes ao grupo controle, apesar do tratamento com o Corticosteróide.
- A reversão dos efeitos deletérios do Corticosteróide sobre o tecido ósseo e sobre a osseointegração, atingida pelo Ácido Zoledrônico, administrado em dose única, evidencia a importância terapêutica desta droga

REFERÊNCIAS

Amorim; M.A., Takayama; L., Jorgetti V.; Pereira R. M. Comparative study of axial and femoral bone mineral density and parameters of mandibular bone quality in patients receiving dental implants. *Osteoporosis International* 2006; 10: 1494-500.

Baxter J. C.; Fattore L. Osteoporosis and osseointegration of implants. *J Prosthodont.* 1993; 2: 120-5.

Branemark P.I.; Adel R; Beine U; Lindstrom J; Hallen O; Ohman A. Experience from 10 years period. *Scand J Plast Rec Surg*, 1977; 2(16)1-132.

Branemark, P.I., Grondahl, K. & Branemark, B. K. (2005). Why osseointegration would work and how it did in the first patients treated. Basic facts and philosophical thoughts. In: *The Osseointegration book: from calvaum to calcaneus*, 1st edition, chapter 3 Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin.

Beikler T.; Fleming T.F. Implants in the medically compromised patient. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14 (4):305-16

,

Bijlsma, J.W.J., Van Everdingen, A., Huisman, M., De Nijs, R.N.J.T.L. & Jacobs, J.W.G. Glucocorticoids in Rheumatoid Arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002; 966: 82-90

Canalis, E. & Delany, A. Mechanisms of glucocorticoid action in bone. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002; 966: 73-81.

Carvalho P.S.; Ponzoni D. *Biologia da Osseointegração*. in *Implantes Osteointegrados.Técnica e arte* .Ed Santos, 1ª ed,2002.

Chavassieux P.; Buffet A. ; Vergnaud P.; Garnero P.; Meunier P.J. Short-term effects of corticosteroids on trabecular bone remodeling in old ewes. *Bone* 1997; 20 (5): 451-455.

Davies J.E. *Bone Engineering*, Toronto Copyright, 656p,2000.

Duarte PM; Nogueira Filho GR; Sallum EA; de Toledo S; Sallum AW; Nociti Júnior FH. The effect of an immunosuppressive therapy and its withdrawal on bone healing around titanium implants. A histometric study in rabbits. *J Periodontol* 2001; 72 (10):1391-1397

Eder A; Watzek G. Treatment of a patient with severe osteoporosis and chronic polyarthritis with fixed implant- supported prosthesis: A case report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14: 587-590

El AsKary AS, Meffert RM, Griffin T. Why do dental implants fail? Part 1. Impl. Dentistry. 1999; 8(2): 173-185

Elsubeihi ES, Zarb G. A. Implant Prosthodontics in medically challenged patients: the University of Toronto Experience. J Can Dent Assoc 2002; 68(2): 103-108.

Fini M; Giavaresi G; Torricelli P, Borsari V; Giardino R; Nicolini A; Carpi A. Osteoporosis and biomaterial osteointegration. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2004.

Friberg B. Treatment with dental implants in patients with severe osteoporosis: a case report. Int. J. Periodontol. 1994; 14 (4): 349-353.

Fujimoto T, Niimi A, Nakai H, Ueda M. Osseointegrated implants in a patient with osteoporosis: a case report. Int J Oral Maxillofac Implants 1996; 11: 539-542

Grardel B.; Sutter B.; Flautre E.; Virguier E.; Lavaste F.; Hardouin P. Effect of glucocorticoids on skeletal growth in rabbits evaluated by dual-photon absorptiometry, microscopic connectivity and vertebral compressive strength. Osteoporosis Int 1994; 4: 204-210.

Grodstein F; Colditz GA; Stampfer MJ. Tooth loss and hormone use in postmenopausal women. *Compend Contin Educ Dent Suppl*, 1998; (22): S9-16.

Jarret S.J.; Conaghan P.G.; Sloan V.S.; Papanastasiou p.; Ortmann C.; O Connor P.; Grainger A; Emery P. Preliminary Evidence for a structural benefit of the new biphosphonate zoledronic acid in early rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2006; 54(5): 1410-1414.

Kasugai S. Dental Implant treatment to osteoporosis patients. *Clin Calcium* 2006; 16 (2): 124-9.

Kazmierczack W; Fiegler P; Przybylek K; Kaminski K; Fiegler-Mercik, H; Wegrzyn P. Changes to the periodontum in postmenopausal women. *Ginekol Pol*, 2005; 76(2): 163-7.

Keller J.C.; Stewart M.; Roehm M; Schneider G.B. Osteoporosis-like bone conditions after osseointegration of implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004; 19:687-94.

Laurindo IMM; Mendes FL; Novaes GS; Mello SBV; Falco V; Jorgetti V. Methotrexate inhibition of bone mineral density increase in growing rabbits: Prevention by folic acid. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2003; 21: 581-586

LeGeros RZ, Craig RG. Strategies to affect bone remodeling: Osteointegration. J Oral of Bone and Mineral Res. 1993; 8(2): 583-596.

Lima LA, Fuchs-Wehrle AM, Lang NP, Hammerle CH, Liberti E, Pompeu E, Todescan JH. Surface characteristics of implants influence their bone integration after simultaneous placement of implant and GBR membrane. Clinical Oral Implants Research 2003; 14(6):669-79

Little DG; Smith NC; Williams PR; Briody JN; Bilston LE; Smith EJ; Gardiner EM; Cowell CT. Zoledronic Acid Prevents Osteopenia and Increases Bone Strength in a Rabbit Model of Distraction Osteogenesis. J Bone Miner Res 2003; 18:1300-1307

Lugero GG; Caparbo VF; Guzzo ML; Konig B; Jorgetti V. Histomorphometric evaluation of implants in osteoporotic rabbits. Implant Dent 2000; 9 (4):303-309

Luppen CA, Blake CA, Ammirati KM, Stevens ML, Seeherman HJ, Wozney JM, Bouxsein ML. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances osteotomy healing in glucocorticoid- treated rabbits. J Bone Miner Res. 2002 Feb; 17 (2):301-10.

Maenaut K; Westhovens R; Dequeker J. Methotrexate Osteopathy, does it exist? The journal of Rheumatology, 1996; 23 (12):2156-59.

May K.P.; Mercill D.; McDermott M.T.; West S.G. The effect of methotrexate on mouse bone cells in culture. *Arthritis & Rheumatism*, 1996 ;39 (6): 489-94.

May KP; Sterling GW; McDermott MT; Huffer WE. The effect of low-dose methotrexate on bone metabolism and histomorphometry in rats. *Arthritis & Rheumatism* 1994; 37(2): 201-206.

Mello, S. V., Barros, D. M., Silva, A. S., Laurindo I.M. & Novaes, G. S. Methotrexate as a preferential cyclooxygenase 2 inhibitor in whole blood of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2000; 39:533-6.

Miedany YM; Abubakr IH; Baddini M. Effect of low dose methotrexate on markers of bone metabolism in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology* 1998; 25:11 2083-2087.

Misch, C. Avaliação medica do paciente candidato a implante. In: *Implantes dentários contemporâneos*. 2nd edition. Livraria Santos Editora Ltda, 2000.

Moell C.; Garwicz S. High-dose methotrexate causes short-term suppression of growth in rabbits. *Acta Paediatr.*1995; 84 (11): 1237-40.

Mori H, Manabe M, Kurachi Y, Naguno M. Osseointegration of dental implants in rabbit bone with low mineral density. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* 1997; 55: 351-61.

Novaes, G. S., Mello, S. B., Laurindo, I.M. & Cossemelli, W. Low dose methotrexate decreases intraarticular prostaglandin and interleukin 1 levels in antigen induced arthritis in rabbits. *Journal of Rheumatology*, 1996; 23 :2092-7.

Parikka V; Lehenkari P; Sassi M; Hallen JR; Ristelo J; Harkonen P; Vaananen HK. Estrogen reduces the depth of resorption pits by disturbing the organic bone matrix degradation activity of mature osteoclasts. *Endocrinology* 142 (12):5371-78.

Patel S.; Patel G.; Johnson D.; Ogunremi L.; Barron, J. Effect of low dose weekly methotrexate on bone mineral density and bone turnover. *Ann Rheum. Dis.* 2003; 62 (2): 186-187.

Payne J. B.; Reinhardt R. A.; Maze C. A.; Patil KD; Gallagher SJ; Mattson JS. Influence of estrogen and osteopenia/osteoporosis on clinical periodontitis in postmenopausal women. *J Periodontol* 1999; 70 (8): 823-8.

Pereira R. M. R.; Delany A.M.; Canalis E. Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis of osteoblasts in culture. *Bone* 2001; 28(5): 484-90.

Ratner, B.D. A Perspective on Titanium Biocompatibility. In: Brunette, D.M., Tengvall, P., Textor M. & Thomsen, P., eds. *Titanium in Medicine*, 1-12. Berlin & Heidelberg: Springer-Verlag.

Ronderos M; Jacobs DR; Himes JH; Pihlstrom, BL. Associations of periodontal disease with femoral bone mineral density and estrogen replacement therapy: cross-sectional evaluation of US adults from NHANES III. *J Clin Periodontol*, 2000; 27(10): 778-86.

Sakakura C.E.; Giro G., Gonçalves D., Pereira R.M., Orrico S.R., Marcantonio E. Jr. Radiographic assessment of bone density around integrated titanium implants after ovariectomy in rats. *Clinical Oral Implants Research* 2006; 17(2):134-8.

Sallo T; Makela M; Uitto VJ; Larjava H. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J Dent Res* 1994; 73 (8): 1397-406.

Sanfilippo F; Bianchi AE. Osteoporosis: the effect on maxillary bone resorption and therapeutic possibilities by means of implant prostheses--a

literature review and clinical considerations Int J Periodontics Restorative Dent 2003; 23(5):447-57.

Scheven BAA; Veen MJ; Damen CA; Lafeber FPJG; Van Rijn HJM; Bijlsma JWW; Duursma SA. Effects of methotrexate on human osteoblasts in vitro: Modulation by 1,25-Dihydroxyvitamin D3. J Bone and Mineral Res 1995;10(6): 874-880.

Spiekermann H. Implantologia. Artes Médicas, 2000.

Starck W.T.; Epiker B. Failure of osseointegrated dental implants after diphosphonate therapy for osteoporosis: a case report. Int J Oral Maxillofac Implants 1995; 10: 74-8.

Steiner M.; Ramp W.K. Endosseous dental implants and the glucocorticoid-dependent patient. J. Oral Implantology 1990; 16(3): 211-217.

Toft p; Tonnesen E; Svendsen P; Rasmussen W. Redistribution of lymphocytes after cortisol administration. APMIS 1992; 154-158.

Van den Broek AA; Keuning FJ; Soeharto R; Prop N. Immune Supression and Histophysiology of the immune response. Virchows Archc Cell Pathol 1983; 43: 43-54.

Van SteenbergheD, Jacobs R, Desnyder M, Maffei G, Quirynen M. The relative impact of local and endogenous patient-related factors on implant failure up to the abutment stage. Clin. Oral Impl. Res.2002; 13: 617-622.

Von Wowern N. General and oral aspects of osteoporosis: a review. Clin Oral Investig 2001; 5(2):71-82.

Waters R; Gamradt S; Asnis P; Vickery B; Avnur Z; Hill E; Bostrom M. Systemic corticosteroids inhibit bone healing in a rabbit ulnar osteotomy model. Acta Orthop Scand 2000; 71(3): 316-321.

Weng D; Hoffmeyer M; Hürzeler MB; Richter EJ. Osseointegration vs. machined surface in poor bone quality. A study in dogs. Clin Oral Implants Res; 14(6):703-8, 2003 Dec

Zarb G.A.; Schmitt A. Osseointegration for elderly patients: the Totonto study. J Prosthet Dent 1994; 72: 559-68.

Zonneveld I.M.; Bakker W.K.; Dijkstra P.F.; Bos J. D.; Van Soesbergen; Dinant H.J. Methotrexate Osteopathy in long-term, low- dose methotrexate treatment for psoriasis and rheumatoid arthritis. Arch Dermatol 1996; 32 (2):184-187.