



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL: DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENDODONTIA

JULIANO BUSETTI

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DA REGENERAÇÃO
ÓSSEA GUIADA SOB MEMBRANAS BIOLÓGICAS NÃO REABSORVÍVEIS EM
RATAS OSTEOPORÓTICAS COM E SEM TRATAMENTO COM ÁCIDO
ZOLEDRÔNICO**

Porto Alegre
2015

JULIANO BUSETTI

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DA REGENERAÇÃO
ÓSSEA GUIADA SOB MEMBRANAS BIOLÓGICAS NÃO REABSORVÍVEIS EM
RATAS OSTEOPORÓTICAS COM E SEM TRATAMENTO COM ÁCIDO
ZOLEDRÔNICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na área de concentração de Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo

Porto Alegre
2015

JULIANO BUSETTI

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DA REGENERAÇÃO
ÓSSEA GUIADA SOB MEMBRANAS BIOLÓGICAS NÃO REABSORVÍVEIS EM
RATAS OSTEOPORÓTICAS COM E SEM TRATAMENTO COM ÁCIDO
ZOLEDRÔNICO**

Linha de Pesquisa: Enfermidades da Região
Bucamaxilofacial - estudos clínicos, imunológicos e
anátomo-patológicos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção
do título de Doutor em Odontologia, na área de
concentração de Endodontia.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Renata Cimões

Profa. Dra. Marilene Issa Fernandes

Prof. Dr. Guilherme Genehr Fritscher

Profa. Dra. Nicole Radhe

DEDICATÓRIA

As escolhas de uma vida são o reflexo de nossas bases. A intensidade destas escolhas é o resultado da maneira como encaramos a vida. Eu dedico esta tese, primeiramente, aos meus pais, Antenor e Virgínia, por terem me dado, através de seu amor, caráter e muita dedicação a minha base de bons exemplos e harmonia familiar.

Aos meus irmãos e sobrinhos, Luciana, Marco, João Pedro, Rodrigo e Rafael, por torcerem sempre por mim e por fazerem parte das minhas conquistas. Adiciono aqui, na condição de amor de irmão de coração, à amiga Renata Cimões e sua família, com quem compartilhei a experiência de morar e estudar fora do país. Apesar da distância geográfica, seguimos perto de coração.

Aos meus amigos, por, apesar de eu estar um tanto afastado, vibrarem comigo cada momento e por serem compreensivos da minha ausência.

Ao Carlos, por ter me dado a chance de fugir dos caminhos tradicionais e de evoluir em aspectos que sozinho seria muito difícil de acontecer. Ao carinho da Luciane e da Camila, que se tornaram parte da minha família.

Por fim, aos meus familiares que sempre torceram muito por mim e à Hira, minha avó, que tanta falta me faz.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, agradeço a todos os anos nos quais fui acolhido nesta que é uma das melhores faculdades de odontologia do Brasil. Tive o prazer de conviver com professores, funcionários e colegas que deixaram excelentes lembranças da minha graduação. À Faculdade de Odontologia da PUC/RS pela oportunidade de ter sido aluno de mestrado e doutorado, tendo minha bolsa provida por esta universidade durante todos estes anos.

À disciplina de periodontia da UFRGS, que me deu boas lições e guiou-me neste mundo da odontologia baseada em evidências. Sem sombra de dúvidas minha busca pelo conhecimento e pela excelência no ensino parte dos ensinamentos de vocês. Em especial à Dra. Marilene Issa Fernandes, minha orientadora enquanto aluno de pós-graduação em Periodontia, muito obrigado.

Ao curso de especialização em Implantodontia da ABO/RS, coordenado, na época, pelo Prof. Dr. Waldemar Daut Polido registro a imensa gratidão por terem me ensinado as técnicas que hoje, através desta tese, aprofundei em conhecimento teórico. Bons amigos eu fiz, como as colegas Mirela Starhan, Letícia Costi e o colega Carlos Augusto Accorsi Riberito. Ao Dr. Waldemar que me apresentou as possibilidades de buscar uma residência clínica e de pesquisa, no exterior, além de abrir as portas de sua clínica para que eu o auxiliasse, durante os anos em que era seu aluno. Com certeza me ajudou a conquistar um dos meus maiores sonhos, o de estudar em uma universidade fora do país.

Ao Dr. José Antônio Poli de Figueiredo e à Dra. Maria Antônia Zancanaro de Figueiredo por terem confiado em mim, sendo meus orientadores e me guiando para que eu tivesse chances de conseguir uma bolsa de estudos e partir para a University College of London, no Eastman Dental Hospital. Fig! Podes não saber, mas estes não foram anos fáceis, porém os melhores da minha vida.

Aos Drs. Nikolaos Donos e Nikos Mardas, meus orientadores e mestres do Eastman Dental Hospital, um obrigado pelo acolhimento enquanto em Londres e pelo conhecimento compartilhado.

AGRADECIMENTO AOS COLABORADORES

Ao INTOX (Instituto de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da PUC/RS), obrigado por me emprestarem suas dependências assim como pela assistência prestada para que minha pesquisa fosse executada com qualidade. Agradeço às cirurgiãs-dentistas Bruna Germani e Bruna Ratzkowski que, na época da execução desta pesquisa, eram alunas de odontologia e me auxiliaram tanto na execução dos experimentos como no cuidado com os animais.

Ao técnico Tiago Giuliani agradeço pela elaboração e processamento das diversas lâminas de microscópio utilizadas para que chegássemos aos resultados aqui apresentados. Sempre prestativo e disponível, me surpreendeu pela cordialidade com que me atendeu. Ao laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da PUC/RS que me emprestou suas dependências e equipamentos para registro das imagens histológicas.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação da Faculdade de Odontologia da PUC/RS agradeço pela paciência em me assistirem nas mais diversas dúvidas.

Ao Médico Veterinário Luciano Trevisan pela elaboração e fornecimento das rações hipocálicas utilizadas nesta pesquisa.

Ao Dr. Luís André Mezzomo e à Dra. Roberta Kochenborger Scarparo, membros deste grupo de pesquisa, muito obrigado pelo apoio clínico e teórico na elaboração do trabalho de pesquisa aqui apresentado.

RESUMO

Regeneração de tecido ósseo perdido pode ser alcançada de forma previsível utilizando-se o conceito de Regeneração Óssea Guiada (ROG). O desenvolvimento deste conceito é baseado na observação de que para realizar a regeneração de um tipo de tecido, células específicas, com habilidade de regenerar este tecido especificamente, devem repopular a ferida. Quando ROG foi utilizada para regeneração de vários tipos de defeitos ósseos, o isolamento destes, com o uso de barreiras físicas reabsorvíveis e não reabsorvíveis, as membranas, resultou em uma cicatrização previsível através da formação de novo tecido ósseo. Atualmente, o princípio de ROG é usado para o tratamento de várias situações clínicas na odontologia, com ou sem o uso associado de implantes dentários.

Osteoporose é a doença óssea crônica mais prevalente e pode interferir na cicatrização de procedimentos regenerativos. O aumento na expectativa de vida da população resulta em um maior número de pacientes idosos indicados para regeneração óssea e implantes dentários. Considerando que a osteoporose está relacionada com fatores como idade, menopausa e uso crônico de alguns tipos de fármacos, a prevalência desta doença é alta. Protocolos regenerativos devem ser postulados levando-se em conta esta categoria de pacientes. Porém, limitada evidência científica sugere que osteoporose pode influenciar negativamente a cicatrização óssea assim como a osseointegração de implantes dentários. Somado à doença, o uso de drogas para prevenção e tratamento da osteoporose pode influenciar na cicatrização de procedimentos regenerativos.

Bisfosfonatos (BF) são os fármacos mais utilizados para tratamento da osteoporose. A droga age na inibição da reabsorção óssea através da sua ação principalmente sobre os osteoclastos. Dentre os BF existentes comercialmente, o ácido zoledrônico (AZ) é reconhecidamente o mais potente de todos.

Sendo assim, o primeiro artigo desta tese buscou criar condições de osteoporose em ratas e, nestes animais, procedimentos regenerativos foram feitos comparando amostras com e sem osteoporose assim como com e sem o uso de AZ. Para avaliar ROG, defeitos críticos (CSD) foram feitos na calvária dos animais. Membranas não reabsorvíveis microporosas de teflon foram utilizadas para ROG em animais saudáveis,

osteoporóticos e osteoporóticos tratados com AZ. Quarenta e oito ratas Wistar, com 6 meses de idade, foram incluídas no estudo. Osteoporose experimental foi induzida através de ovariectomia (OVX) associada à dieta hipocálcica em 32 animais. Dezesesseis ratos OVX receberam uma dose única de AZ (OZ) enquanto as outras 16 ratas osteoporóticas não receberam tratamento (O). Os demais 16 animais foram submetidos à cirurgia controle, onde os ovários não foram removidos, sendo considerado o grupo controle (C). Seis semanas após a indução da osteoporose, o grupo OZ recebeu uma dose única de AZ. Após mais uma semana (7 semanas após OVX), dois CSD de 5 mm foram feitos, bilateralmente, nos ossos parietais, sendo que um destes defeitos foi tratado com duas membranas, uma instalada internamente ao defeito, sobre a dura mater, e outra na porção externa. Os períodos de cicatrização de ROG foram de 30 e 60 dias para cada grupo. Avaliação da formação de tecido ósseo (NBF) foi feita através de análise histológica qualitativa e quantitativa. Diferenças entre as médias entre os grupos (O, OZ e C), o uso de membranas assim como o período de observação (30 e 60 dias) foram analisados através de ANOVA para cada variável. Quando uma diferença estatística era identificada entre as médias, o teste pós hoc Bonferroni foi utilizado. Os resultados mostraram que o tratamento com AZ ($p=0,001$) e o uso de membranas ($p=0,000$) aumentaram significativamente a quantidade de tecido ósseo regenerado e que a presença de osteoporose pode ter reduzido a formação de novo osso ($p=0,028$).

Palavras-Chave (DeCS): Regeneração Óssea Guiada. Ácido Zoledrônico. Ratas. Osteoporose.

ABSTRACT

Regeneration of lost tissues can be obtained in a predictable way by using the Guided Bone Regeneration (GBR) concept. The development of such concept is based on the observation that to regenerate a certain type of tissue, specific cells with the ability to reconstruct such kind of tissue must repopulate the wound. GBR was applied to heal different type of bone defects and the isolation of it by using resorbable and non-resorbable membranes resulted in a predictable healing through the formation of new bone. Nowadays the GBR concept is used for the treatment of multiple clinical situations in dentistry, even with dental implants.

Osteoporosis is the most common chronic bone disease and may interfere in the healing of regenerative procedures. The increase in life expectancy results in a larger number of elderly patients referred for bone regeneration and dental implants. Osteoporosis is associated with aging, menopause and chronic use of some types of drugs. Regenerative protocols must be postulated taking into account this category of patients. Limited scientific evidence suggests that osteoporosis can negatively influence bone healing as well as the osseointegration of dental implants. In addition to disease, the use of drugs for its prevention and treatment may affect healing of GBR procedures. Bisphosphonates (BP) are the most frequently used drugs for treatment and prevention of osteoporosis. The drug acts mainly in the inhibition of bone resorption by its action on osteoclasts. Among the commercially prescribed BP, zoledronic acid (ZA) is known to be the most potent of all.

In the first paper of this thesis osteoporosis was induced in rats and these animals were submitted to regenerative procedures comparing samples with and without osteoporosis as well as with and without the use of ZA. To assess GBR, critical size defects (CSD) were made in the animals' calvarial bone. Microporous non-resorbable PTFE (polytetrafluorethylene) membranes were used to promote GBR in healthy, osteoporotic and osteoporotic animals treated with ZA. Forty-eight Wistar rats with 6 months of age were included in the study. Experimental osteoporosis was induced by ovariectomy (OVX) associated with hipocalcic diet in 32 animals. Sixteen OVX rats received a single dose of ZA (OZ) while the other 16 osteoporotic rats received no treatment (O). The remaining 16 animals were SHAM operated; the ovaries were

exposed but not removed, being considered the control group (C). Six weeks after osteoporosis induction, each animal from the OZ group received a single dose of ZA. One week later (7 weeks after baseline) two 5-mm CSD were performed bilaterally in the parietal bones and one of these defects was treated with two membranes, one located internally, in contact to the Dura, and the other was placed on top of the defect. GBR healing periods were 30 and 60 days for each group. Evaluation of new bone formation (NBF) was done by qualitative and quantitative histological analysis. Differences in means between groups (O, OZ and C), the use of membranes as well as the observation period (days 30 and 60) were analyzed by ANOVA for each variable. When a statistically significant difference was identified between the averages, the Bonferroni post hoc test was used. The results showed that treatment with ZA ($p = 0.001$) and the use of membranes ($p = 0.000$) significantly increased the amount of regenerated bone tissue and the presence of osteoporosis may have reduced NBF ($p = 0.028$).

Key words: Guided Bone Regeneration. Zoledronic Acid. Rats. Osteoporosis.

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Carta de aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia/PUCRS.

Anexo B – Carta de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/PUCRS.

Anexo C – Carta de submissão do Artigo 1 ao periódico *Clinical Oral Implants Research*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. FISILOGIA ÓSSEA	13
1.2. CICATRIZAÇÃO ÓSSEA.....	15
1.3. REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA.....	16
1.4. O PRINCÍPIO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA.....	17
1.5. ENXERTOS ÓSSEOS	20
1.6. EVENTOS CICATRICIAIS EM ROG	21
1.7. DEFEITOS CRÍTICOS.....	22
1.8. MODELO IN VIVO PARA ESTUDOS DE BIOMATERIAIS	24
1.9. OSTEOPOROSE	25
1.10. BISFOSFONATOS	27
1.11. EFEITOS DA OSTEOPOROSE NA ROG	30
2. OBJETIVOS	33
2.1. OBJETIVO GERAL	33
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3. ARTIGO 1.....	34
4. ARTIGO 2.....	71
5. DISCUSSÃO	84
6. CONCLUSÕES	91
7. REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	92
8. ANEXOS	115

1. INTRODUÇÃO

1.1. FISIOLOGIA ÓSSEA

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especializado, composto por uma matriz orgânica mineralizada, tendo como funções principais suporte estrutural para o corpo, proteção de órgãos e estruturas internas. Responsável pela homeostasia do volume mineral circulante, serve também de reservatório de cálcio (FERGUSON *et al.*, 1998).

O composto orgânico do tecido ósseo varia de 20 a 40% sendo, a parte mineral entre 50 e 70%, água e lipídios são menos de 3% da sua composição. O principal conteúdo da parte mineral é a hidroxiapatita, representando cerca de 95%. Já a matriz orgânica é composta por em torno de 90% de proteínas de colágeno, especialmente do tipo I, com alguns traços de colágeno dos tipos III e V. Proteínas não colagenosas como osteocalcina, osteonectina, proteoglicanos, variados fatores de crescimento e proteínas ósseas morfogenéticas também constituem a matriz óssea orgânica (AVOLIO *et al.*, 2008).

O esqueleto humano é composto por 80% de osso cortical e 20% de medular. O tecido ósseo cortical é denso e sólido, circundando o osso medular. Esse, por sua vez, apresenta-se como osso trabeculado composto por espaços medulares. Tanto o tecido ósseo cortical como o medular são formados por ósteons, que é a unidade funcional do osso. Os ósteons ou sistema de Havers são formados por lamelas ósseas em torno dos canais de Havers e contém capilares sanguíneos e nervos. Os sistemas de Havers comunicam-se através de canais intersticiais chamados de canais de Volkmann. Osteoblastos, osteoclastos e osteócitos são as células responsáveis pela formação e remodelamento ósseo (MARKS, 2002; MACKIE, 2003).

Os osteoblastos são originados de células mesenquimais primitivas indiferenciadas originadas na medula óssea e estão localizados nas superfícies ósseas. A proliferação e diferenciação dos osteoblastos ocorre a partir das células indiferenciadas sob influência de fatores de transcrição, de crescimento e hormônios. Os fatores de transcrição Cbfa-1/Runx-2 são responsáveis pela expressão genética dos

osteoblastos. Fatores de crescimento como o fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) e proteínas ósseas morfogenéticas, durante o processo de formação e maturação óssea, são produzidos pelos osteoblastos e ficam presos na matriz óssea, sendo liberados na fase de reabsorção óssea, feita pelas células osteoclásticas. Tal liberação é responsável pela manutenção do equilíbrio de estímulo para novos osteoblastos. Sistemicamente, os hormônios paratireóides (PTH) estimulam a diferenciação de células indiferenciadas em osteoblastos (MACKIE, 2003).

As células osteoblásticas ativas apresentam complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso proeminentes. A principal função dos osteoblastos é secretar a complexa mistura de proteínas que formam a matriz óssea. O tecido ósseo secretado inicialmente chama-se osteóide. Colágeno do tipo I é responsável por 90% da matriz orgânica do tecido ósseo, formando a estrutura de fibras nas quais a matriz mineral é depositada. Os osteoblastos são responsáveis pela mineralização dos osteóides através da mobilização de enzimas que regulam proteínas tais como fosfatase alcalina, assim como pela secreção da proteína osteocalcina. A fosfatase alcalina é necessária para a alcalinização do meio, facilitando a deposição de minerais, enquanto que a osteocalcina atuará na fixação do cálcio e da hidroxiapatita na matriz extracelular, sendo uma das principais responsáveis pela mineralização do osso. Os osteoblastos também atuam na regulação da diferenciação e da atividade das células clásticas, os osteoclastos (MACKIE, 2003; AVOLIO *et al.*, 2008). No processo de formação de matriz óssea, alguns osteoblastos sofrem apoptose (morte celular) enquanto outros ficam circundados pela própria matriz secretada, formando os osteócitos e paralisando o processo de produção de osteóide (MACKIE, 2003).

Osteócitos são células originados dos osteoblastos que tornam-se envoltos na matriz óssea mineralizada, mantendo-se unidos por uma complexa rede de canalículos. Atuam na resposta à carga mecânica assim como no processo de remodelamento do tecido ósseo (GRAHAM *et al.*, 2006).

Osteoclastos são células multinucleadas formadas na medula óssea e cuja função é reabsorção óssea. A diferenciação dos osteoclastos tem origem nos osteoblastos, que secretam fatores de estímulo na superfície celular como o fator receptor ativador RANKL que se liga ao receptor RANK presente em células

mononucleares, precursoras dos osteoclastos, as quais se fundem formando células multinucleares. Os osteoclastos exercem como função principal a reabsorção óssea, através de sua adesão na superfície do osso. Depois de aderida, a célula secreta ácido (H⁺) para dissolver o conteúdo mineral enquanto enzimas proteolíticas digerem a matriz óssea. Após, sofrem apoptose, liberando moléculas que são reguladoras do metabolismo ósseo (GRAHAM *et al.*, 2006).

1.2. CICATRIZAÇÃO ÓSSEA

A origem embrionária do tecido ósseo também influencia no seu padrão de cicatrização. Em ossos longos, a cicatrização de fraturas ocorre através da formação de um calo antes da deposição do tecido ósseo lamelar, sendo o calo responsável por reestruturar o tecido. Já em ossos com origem intramembranosa a presença do calo não acontece. (MARKS; ODGREN, 2002)

Fases de cicatrização óssea:

1- Formação de coágulo sanguíneo: a lesão óssea determina o rompimento de vasos e a ocorrência de hemorragia no local do recém criado defeito ósseo. Após, forma-se um coágulo sanguíneo pela adesão de plaquetas a formação de uma rede de fibrina. As plaquetas liberam fatores de crescimento como TGF- β que estimulam a formação de matriz extracelular e a proliferação de células mesenquimais indiferenciadas, que antecedem os osteoblastos (SINGER; CLARK, 1999).

2- Fase inflamatória: ocorre o recrutamento de células inflamatórias e liberação de mediadores pró-inflamatórios na região da ferida. Nas primeiras 24 a 48 horas, a grande maioria das células são neutrófilos e macrófagos. Tais células são responsáveis pela ação de combater possíveis infecções, remover o coágulo ali formado assim como liberar fatores de crescimento e citocinas que irão ativar a diferenciação das células mesenquimais em células formadoras de osso. A partir de então, as células irão depositar uma matriz extracelular de colágeno que, junto com a nova rede de vasos, irão substituir o coágulo por tecido de granulação. Este, por sua vez, servirá como uma fonte de células osteoprogenitoras que produzirão osteóide (MACKIE, 2003).

3- Fase proliferativa: a formação óssea inicia-se através do estímulo das células progenitoras dos osteoblastos. Após sua diferenciação e maturação, os osteoblastos produzem colágeno e matriz osteóide que sofrerão mineralização formando tecido ósseo lamelar. O tecido ósseo recém formado será circundado por vasos sanguíneos, tornando-se mais espesso e sofrendo sua maturação (MACKIE, 2003).

4- Remodelamento: é a última etapa da cicatrização óssea, envolvendo a substituição do tecido osteóide por osso lamelar (COWLES *et al.*, 1998). O processo de remodelamento consiste na reabsorção e formação de novo osso. Este balanço entre reabsorção e formação é regulado por fatores de crescimento, hormônios assim como pela interação direta entre osteoblastos e osteoclastos. Gradualmente, tecido osteóide é substituído por osso lamelar (MACKIE, 2003).

1.3. REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA

O termo regeneração significa reproduzir ou reconstituir um tecido injuriado ou perdido (KARRING *et al.*, 1980; 1984). Já o conceito de reparo refere-se à cicatrização de uma ferida por um tecido que não reestabelece a arquitetura e função idênticas à original (MELCHER, 1976).

Reparo ósseo atribui-se quando o tecido é cicatrizado por outro que não seja osso e que não tenha a mesma estrutura nem exerça as mesmas funções que este (BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1995). O princípio de regeneração tecidual guiada (RTG) foi desenvolvido a partir da observação de que para regenerar qualquer tecido, células específicas para originar tal tecido devem repovoar seletivamente a ferida (KARRING *et al.*, 1993). Uma série de estudos, testando o uso de membranas como barreiras físicas, foi desenvolvida em diferentes ambientes cicatriciais, avaliando a dinâmica das variadas populações celulares. Concluiu-se que a regeneração de um tipo de tecido é alcançada quando células específicas, progenitoras do tecido lesionado, repovoam a ferida durante a fase cicatricial (GOTTLOW *et al.*, 1984; GOTTLOW, 1993).

1.4. O PRINCÍPIO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA

A Regeneração Óssea Guiada (ROG) tem como foco regenerar defeitos ósseos alveolares através de técnicas que promovam a reconstituição do tecido perdido, protegidas por uma barreira física. O princípio biológico é baseado na exclusão mecânica de tecidos moles adjacentes permitindo que somente células osteogênicas originárias das bordas do defeito ósseo repovoem a ferida (RETZEPI; DONOS, 2010). Murray, Holden, Roshlau (1957) observaram a formação de tecido ósseo sob barreiras aplicadas no fêmur e íliaco de cães. Os autores concluíram que tais barreiras permitiram a formação e estabilização de um coágulo sanguíneo impedindo a penetração de tecido mole na área, o que resultou na formação de novo osso.

Os estudos iniciais sobre ROG enfatizavam a estabilização do coágulo sanguíneo mais do que a exclusão da presença de tecido mole e o repovoamento dos defeitos por células osteogênicas (HURLEY *et al.*, 1959; RUEDI; BASSETT, 1967). A partir os anos 1980, demonstrou-se que a exclusão de tecidos indesejados permitiria que somente células osteogênicas originadas do próprio tecido ósseo repovoassem a ferida na fase cicatricial (NYMAN *et al.*, 1982; DAHLIN *et al.*, 1988; HAMMERLE *et al.*, 1995).

A importância da exclusão seletiva de células dá-se pelo fato que a migração de células progenitoras de osteoblastos ocorre de forma mais lenta quando comparada a fibroblastos e a células epiteliais. A presença de uma membrana, como barreira física, gera um ambiente isolado permitindo que células osteoprogenitoras possam lentamente proliferar-se na ferida, diferenciando-se em osteoblastos (KARRING *et al.*, 1993, LINDE *et al.*, 1993). Estudos histológicos, pré-clínicos, demonstraram que tecido fibroso é quase sempre achado em defeitos não protegidos por barreiras (RETZEPI; DONOS, 2010).

O protocolo terapêutico para ROG envolve a instalação cirúrgica de uma membrana oclusiva para promover o selamento do sítio ósseo que necessita de regeneração (DAHLIN *et al.*, 1988; RETZEPI; LEWIS; DONOS, 2010). Alguns critérios clínicos considerando os tipos de membrana para ROG têm sido postulados e incluem biocompatibilidade, propriedades de oclusão celular, integração com os tecidos do

hospedeiro, fácil manipulação cirúrgica, limitada susceptibilidade a complicações e habilidade de manter espaço no defeito a ser tratado (KARRING *et al.*, 1993). Atualmente existem duas grandes categorias de membranas, as reabsorvíveis e as não reabsorvíveis, ou seja, que sofrem biodegradação quando deixadas em contato com a ferida cicatricial.

Membranas não reabsorvíveis são, na sua grande maioria, compostas por politetrafluoretileno expandido (e-PTFE). PTFE expandido é um polímero quimicamente estável e biologicamente inerte que apresenta uma macroestrutura porosa e uma constituição maleável que garante sua capacidade de ocluir o defeito ósseo a ser regenerado, sendo facilmente manipulado (CARBONELL *et al.*, 2014). Por ser biocompatível, não desencadeia reação inflamatória no hospedeiro, além de resistir à degradação causada por bactérias e enzimas (BECMEUR *et al.*, 1990; MAROUF; GUINDI, 2000). O uso de membranas expandidas está comprovado como eficaz e previsível para a finalidade de ROG (RETZEPI; DONOS, 2010).

Membranas de politetrafluoretileno de alta densidade (n-PTFE) são uma alternativa, também não reabsorvível, para e-PTFE. Sua composição é 100% de PTFE não poroso, não expandido e impermeável, apresentando uma menor porosidade que as membranas de e-PTFE (KRAUSER *et al.*, 1996). Algumas membranas de n-PTFE estão disponíveis no mercado, como a Cytoplast Regentex TXT-200 (Osteogenics Biomedical Inc, Lubbock Tx, USA), com sua apresentação em diferentes tamanhos, texturas, com ou sem reforço estrutural de titânio (CARBONELL *et al.*, 2014).

Membranas não reabsorvíveis não sofrem solubilização, exigindo uma segunda intervenção cirúrgica para serem removidas. Esta desvantagem foi responsável pelo desenvolvimento de membranas biodegradáveis. Diversos materiais biodegradáveis foram e são testados com variados índices de sucesso em ROG. Incluem colágeno tipo I, poliuretano, poliglactina 910, ácido polilático, ácido poliglicólico e diferentes copolímeros (SANDBERG *et al.*, 1993; ZELLIN *et al.*, 1995; RETZEPI *et al.*, 2010). Uma vez inserido em um ambiente aquoso, como é o sistema biológico do hospedeiro, os polímeros passam por estágios de biodegradação: hidratação, perda de resistência, perda de integridade e solubilização via fagocitose. O tempo transcorrido em cada estágio depende do tipo do polímero usado, do pH e temperatura assim como do

volume da membrana utilizada (WARRER *et al.*, 1992; HÄMMERLE; JUNG, 2003).

Zellin *et al.* (1995) testou os potenciais de osteopromoção de diversas membranas reabsorvíveis e não reabsorvíveis com relação a sua composição e características físicas. Conclui-se que todos estes tipos de barreiras podem ser usados para ROG levando-se em consideração que todas apresentaram capacidade de manter espaço e seletivamente permitir a entrada de células osteogênicas na ferida. O autor também relatou que o colapso causado pela rápida absorção de algumas membranas reabsorvíveis pode comprometer a cicatrização do tecido ósseo.

Estudos comparando membranas identificaram que, em situações onde não houve exposição das barreiras, os resultados de quantidade de tecido ósseo regenerado foram mais favoráveis para membranas de e-PTFE. Estes resultados foram associados à observação desta em ter maior capacidade de manter espaços e por sua permanência por mais tempo quando comparadas com membranas reabsorvíveis (ITO; MURAI, 1998). Porém foi observado que membranas de e-PTFE comumente foram expostas, o que levou à redução da quantidade de tecido ósseo regenerado (SIMION *et al.*, 1999; WAASDORP; FELDMAN, 2013).

Variados estudos experimentais e clínicos demonstraram que ROG pode ser realizada com sucesso utilizando-se tanto membranas reabsorvíveis quanto não reabsorvíveis (DONOS *et al.*, 2002a; DONOS, 2002b; DONOS *et al.*, 2004; DONOS *et al.*, 2008). As membranas e-PTFE assim como as reabsorvíveis exigem, idealmente, fechamento total do tecido mole sobre elas para prevenir contaminação bacteriana, degradação da ferida assim como exposição do enxerto (BARBER *et al.*, 2007).

Por outro lado, as propriedades de composição de membranas de n-PTFE permitem o não fechamento primário do tecido mole, podendo esta barreira ficar exposta (MONTEIRO *et al.*, 2010). Estudos clínicos demonstraram a viabilidade de ROG em sítios sob membranas de n-PTFE quando expostas ao meio bucal (BARTEE, 1995; YUN *et al.*, 2011).

O uso de barreiras reabsorvíveis elimina a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica, simplificando os protocolos clínicos de ROG. Porém, barreiras não reabsorvíveis são consideradas o padrão ouro para comparar resultados, em pesquisas, quando se estuda o uso de diferentes materiais e protocolos para ROG

(HAMMERLE; JUNG, 2003; RETZEPI; DONOS, 2010).

1.5. ENXERTOS ÓSSEOS

O uso de enxertos ósseos ou de substitutos ósseos no tratamento de defeitos de tecido duro está baseado nos conceitos de osteogênese, osteocondução e osteoindução. A osteogênese acontece pelo uso de materiais que contem células progenitoras de tecido ósseo, enquanto que a osteocondução é alcançada com biomateriais que sirvam como um arcabouço, permitindo a manutenção de espaço para crescimento vascular, perivascular, e o preenchimento por células que irão diferenciarem-se em osteoblastos, originados do hospedeiro e não do próprio enxerto. Já o conceito de osteoindução atribui-se quando o material biológico enxertado possui fatores que estimulam o processo de recrutamento e diferenciação de células osteoprogenitoras (BURCHARDT, 1987).

Os enxertos ósseos podem ser categorizados com base na sua origem (STAVROPOULOS *et al.*, 2015):

- Autógeno – tem como origem o próprio hospedeiro, sendo transferido de uma área doadora para um leito receptor do mesmo indivíduo (ex. enxerto em bloco de mandíbula ou mento).
- Aloenxerto – enxertos de origem dentro da mesma espécie, porém de outro indivíduo (ex. banco de ossos)
- Xenoenxerto – enxertos retirados de outras espécies (ex. enxerto de origem bovina - Bio Oss[®])
- Aloplástico – materiais sintéticos, produzidos em laboratório (ex. fosfato de cálcio bifásico - Straumann Bone Ceramics[®])

Os variados tipos de enxertos e biomateriais são usados em associação com membranas para ROG de diferentes tipos de defeitos ósseos (HAMMERLE *et al.*, 1998; KARRING, 1993; STAVROPOULOS *et al.*, 2015). Apesar desta corriqueira associação de técnicas, o tipo ideal de enxerto a ser escolhido ainda é motivo de controvérsia. As opções consideradas padrão ouro são os de origem autógena, particulado ou em bloco

(JIMI *et al.*, 2012). Porém, devido à morbidade, custos e tempo de cicatrização causados pela necessidade de uma área doadora para a remoção do enxerto, alternativas ao enxerto de origem autógena surgiram e estão sendo estudadas (RETZEPI; DONOS 2010; STAVROPOULOS *et al.*, 2015).

As alternativas mais bem documentadas são o xenoenxerto (enxerto desproteínizado de origem bovina) e o DFDBA (*demineralized freeze-dried bone allograft*) ou aloenxerto desmineralizado liofilizado (originário de banco de ossos). As propriedades osteoindutivas do DFDBA tornaram comum a sua indicação para procedimentos de ROG (DONOS *et al.*, 2008). Estudos descreveram como previsível a ROG com o uso de DFDBA (SIMION *et al.*, 1994). Por outro lado, outros autores demonstraram o DFDBA como um mantenedor de espaço mais do que um material osteoindutor (SPIN-NETO *et al.*, 2013).

Xenoenxerto desproteínizado, de origem bovina, em combinação com membrana colágena reabsorvível tem sido demonstrado como um vetor eficaz para ROG em situações que envolvem regeneração óssea ao redor de implantes, em estudos animais (DONOS *et al.*, 2004) e em humanos (ZITZMANN *et al.*, 2001). Sugere-se que o uso de xenoenxerto otimiza a formação óssea devido a sua ação de osteocondução e por que suas partículas fornecem um suporte mecânico para a membrana (JIMI *et al.*, 2012).

Estudos em macacos e em cães, onde xenoenxerto foi associado a barreiras reabsorvíveis e não reabsorvíveis para ROG, ao redor de implantes, demonstraram uma grande quantidade de osso quando comparados com grupos controle ou grupos onde somente o Bio-Oss[®] (xenoenxerto) fora utilizado, sem membrana (HURZELER *et al.*, 1998; HAMMERLE *et al.*, 1998). Inúmeros estudos atestam o uso de xenoenxerto como uma eficiente medida para ROG (ZITZMANN *et al.*, 2001; HAMMERLE; LANG, 2001).

1.6. EVENTOS CICATRICIAIS EM ROG

Hammerle *et al.* (1995) descreveu as etapas de cicatrização do tecido ósseo, após ROG, em defeitos ósseos criados em calvária de ratos. A regeneração

apresentou-se a partir das bordas dos defeitos em direção à área central. Na primeira semana pós operatória houve formação e proliferação de tecido de granulação acompanhado por uma vasta e organizada rede de vasos sanguíneos antecedendo a formação de osteóide. Nas duas semanas seguintes houve aposição e maturação óssea nas bordas do defeito, enquanto, na parte mais central, tecido osteóide foi encontrado. Os espaços medulares do tecido ósseo em maturação antecipavam a formação e maturação de mais osso. Na quinta semana, tecido ósseo neoformado ocupava mais de 80% da área original do defeito, sendo que 67% deste total originou-se das margens. O processo de remodelamento ósseo, por sua vez, foi percebido a partir do final da segunda semana, tornando-se proeminente do trigésimo quinto dia.

1.7. DEFEITOS CRÍTICOS

O termo defeito crítico (CSD – *critical size defect*) foi definido por Schmitz e Hollinger (1986) como sendo o menor defeito intraósseo que não cicatriza espontaneamente durante a vida de um animal. Segundo Gosain *et al.* (2000), pode-se atribuir o conceito de CSD para defeitos que, em pesquisa com animais, não regeneram espontaneamente durante o período de um estudo.

Um CSD cicatriza, geralmente, sendo preenchido por tecido conjuntivo fibroso ao invés de tecido ósseo, a não ser que ROG seja aplicada. Células osteoblásticas apresentam uma velocidade de ativação menor do que as células do tecido conjuntivo. Sendo assim o defeito é preenchido por outras células que invadem o espaço ocorrendo a cicatrização através de reparo ao invés de regeneração (DAHLIN *et al.*, 1991; BOSCH *et al.*, 1995).

Em ratos, o tamanho ideal de CSD em calvária é de 5mm em diâmetro (BOSCH *et al.*, 1995, DONOS *et al.*, 2004, VAJGEL *et al.*, 2013). Este dado é baseado nos achados de Turnbull e Freeman (1974) que foram os primeiros autores a estudar CSD em ratos. Mulliken e Glowacki (1980) relataram que defeitos de 4mm, em calvária de ratos, não cicatrizaram por um período de 6 meses. Em uma revisão sistemática, Vajgel *et al.* (2013) descreveu, baseado na literatura corrente, que defeitos de 5 mm, em

calvária de ratos, são considerados CSD, com baixíssimas porcentagens de fechamento espontâneo completo (1,6%).

Estudos histológicos demonstraram que CSD não protegidos por membranas para ROG foram preenchidos com tecido fibroso (RETZEPI; DONOS, 2010). O princípio de ROG em CSD foi utilizado de forma pioneira por Dahlin *et al.* (1988) em mandíbulas de ratos. Os autores utilizaram defeitos bilaterais standardizados de 5mm. Um dos defeitos foi deixado vazio, considerado o lado controle, enquanto o contra lateral foi coberto por uma membrana de e-PTFE, sendo este o lado teste. No teste, metade dos animais obtiveram completa regeneração do defeito, após 3 semanas e, após 6 semanas, todos foram completamente regenerados. Porém, no lado controle, pouca ou nenhuma regeneração foi evidenciada após o período total do estudo, de 22 semanas. Sendo assim o autor conclui que a presença de membranas permitiu que células mesenquimais ocupassem a ferida e diferenciaram-se em osteoblastos, permitindo a ROG.

Dahlin *et al.* (1991) e Bosch *et al.* (1995) realizaram estudos em ratos utilizando duas camadas de membrana em osso parietal. Membranas de e-PTFE foram posicionadas em ambos os lados de defeitos críticos, uma na porção interna, sobre a dura-máter e outra, na parte externa do defeito, em contato com o periósteo e tecido conjuntivo. Verna *et al.* (2002) relatou que a oclusão incompleta deste tipo de CSD, permitindo a invasão de conjuntivo das áreas ao redor, impediu a regeneração óssea do defeito. Somado a isso, em situações de colapso da membrana para dentro do defeito crítico, houve a diminuição do espaço para a regeneração, resultando em uma limitada quantidade de osso formado (LUNDGREN *et al.*, 1998).

Mardas *et al.* (2002) demonstrou que o uso de uma camada de membrana de e-PTFE sobre defeitos, em calvária de ratos, e outra, na porção interna, com ou sem a associação com enxerto alógeno, resultou em regeneração substancial após 4 semanas. Donos *et al.* (2004) associou a técnica de dupla membrana com o uso de osso bovino desproteinizado. Os autores concluíram que ROG é previsível com o uso da técnica de duas membranas, em defeitos críticos de 5mm de diâmetro.

Defeitos críticos, em modelo de calvária de ratos, com 5mm de diâmetro, demonstraram baixos níveis de regeneração espontânea. Somado a isso, a calvária

permite que sejam utilizados defeitos bilaterais, dentro da medida de 5mm cada, viabilizando a comparação entre grupos, no mesmo animal (VAJGEL *et al.*, 2013).

1.8. MODELO IN VIVO PARA ESTUDOS DE BIOMATERIAIS

Experimentos pré-clínicos *in vivo* são necessários por motivos éticos, assim como devido a sua segurança, custos e praticidade. Estudos *in vitro* com células, tecidos e demais culturas, como órgãos, apresentam limitada fonte de informação por não fornecerem dados de atividade biológica, de efeitos deletérios e tóxicos. Tal modelo não reproduz situações *in vivo* na totalidade, considerando fatores moleculares e celulares. Estudos em humanos não permitem retiradas de amostras de biópsia como os *in vivo*, que são pré-requisito para estudos em humanos (SCULEAN *et al.*, 2015; STAVROPOULOS *et al.*, 2015).

O uso de animais de pequeno porte é uma alternativa que torna estudos de regeneração óssea e de avaliação de biomateriais viáveis. Tais animais apresentam vantagens em termos de acomodação, manutenção, anatomia, facilidade de manipulação assim como uma baixa incidência de complicações e custos. Por serem mais resistentes a infecções, os níveis de perda de amostra são reduzidos. Somado a estes fatores, o controle genético das amostras, criadas em cativeiro, permite uma menor variação individual entre os animais, em termos de resposta biológica (STAVROPOULOS *et al.*, 2015).

Ao testar CSD, questões anatômicas devem ser levadas em conta pela dimensão necessária para executar o modelo de defeito, com pelo menos 5 mm de diâmetro. O uso das áreas parietais de ratos permite a criação de CSD de forma bilateral, podendo-se criar um lado teste e um controle. Na calvária dos ratos a execução de CSD uniformes é de fácil reprodutibilidade. Somado a isso, o rápido metabolismo do rato torna viável a execução de modelos em um curto período de tempo. Em modelos de ROG, 8 semanas são o suficiente para testar hipóteses envolvendo procedimentos regenerativos, sendo que, após este período, parece ocorrerem somente alterações limitadas, havendo estabilidade dos resultados

(RETIZEPI; DONOS, 2010).

Um estudo *in vivo* somente deve ser proposto se o objetivo da pesquisa apresentar um impacto na vida dos indivíduos. Pesquisas com animais são historicamente responsáveis pela melhora na saúde da população. Porém, o pesquisador deve empregar uma amostra que seja significativa para os objetivos, não extrapolando o número de animais a serem utilizados e boas práticas laboratoriais devem ser conduzidas. Apesar de a transferência dos resultados de pesquisas *in vivo* ser de amplitude limitada para aplicação direta em humanos e do avanço na biologia e tecnologia *in vitro*, somente investigações *in vivo*, até o atual momento, colaboram para o entendimento do complexo molecular, celular e tecidual em respostas regenerativas (SCULEAN *et al.*, 2015).

1.9. OSTEOPOROSE

A osteoporose (OP) é classificada como uma alteração esquelética caracterizada pela diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo levando à fragilidade e conseqüente aumento do risco de fraturas (DERVIS, 2005). Considerada como a doença mais frequente, em tecido duro, na população mundial, dados epidemiológicos indicam que mais de 27 milhões de pessoas sofrem de osteoporose na Europa, com alta prevalência em mulheres caucasianas pós menopausa (HERNLUND *et al.*, 2013). Na América do Norte, projeta-se que a doença irá afetar 14 milhões de adultos, com mais de 50 anos, no ano de 2020 (NATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION, 2002). No Brasil os dados epidemiológicos sobre a doença são escassos. Segundo o portal do ministério da saúde, aproximadamente 10 milhões de brasileiros têm osteoporose (PORTAL DA SAÚDE, 2013). A prevalência da OP é maior em populações mais velhas, sendo que o aumento na expectativa de vida gera um aumento lógico na sua incidência (HERNLUND *et al.*, 2013).

A densitometria óssea é considerada o padrão ouro no diagnóstico da osteoporose, sendo medida utilizando-se dados fornecidos pela absorciometria de raios-X de dupla energia (DEXA). O DEXA (*dual energy x-ray absorptiometry*) identifica a densidade mineral óssea (DMO) da área analisada em unidades de gramas/cm². De

acordo com a OMS (Organização Mundial de Saúde), OP é definida quando a DMO apresenta 2,5 ou mais desvios padrão abaixo do valor médio de DMO do que é o considerado normal para uma jovem mulher saudável. Este valor é chamado de escore – T (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994).

OP pode ser classificada como primária e secundária. A primária é associada à idade e/ou às alterações hormonais, sendo subdividida em tipo um (pós menopáusicas) e tipo dois (osteoporose senil). Já a OP secundária é causada por uso de medicamentos, como corticóides, doenças sistêmicas e por falta de cálcio (RUSSEL *et al.*, 2006).

O tecido ósseo saudável apresenta um equilíbrio entre os processos de reabsorção e formação no qual osteoclastos reabsorvem osso através de acidificação e digestão proteolítica e osteoblastos secretam matriz osteóide no local reabsorvido. Em mulheres pós-menopáusicas a taxa de remodelamento ósseo aumenta, permanecendo elevada por até cerca de 40 anos após a última ovulação, resultando em progressiva perda de massa óssea, tendo em vista que ocorre uma diminuição no tempo de vida dos osteoblastos e aumento da vida útil dos osteoclastos, ficando, estes, mais atuantes (RUSSEL, 2003). A relação da menopausa com OP ocorre devido a queda nos níveis hormonais de estrógeno e aumento dos níveis de paratormônio. Este, por sua vez, provocará elevação do cálcio sanguíneo e diminuição da massa óssea, tanto cortical como medular, que é o mais afetado, por apresentar uma área maior (FERNANDES *et al.*, 1999). Em nível celular, ocorre um desequilíbrio entre as atividades antagônicas de osteoclastos e osteoblastos. O estrógeno tem papel decisivo no remodelamento ósseo e sua deficiência aumenta a osteoclastogênese, tendo em vista que tal hormônio, quando em níveis normais, limita a produção de citocinas osteoclastogênicas pró-inflamatórias como interleucinas 1 e 6 (IL1, IL6) e fatores de necrose tumoral (SAMBROOK; COOPER, 2006).

Osteoporose secundária, causada por corticóides, está associada à redução que o fármaco causa na quantidade de osteoblastos, resultando em rápida perda de tecido ósseo. O uso de corticóides acarreta a supressão da produção de osteoproteogélica (OPG), que, em níveis normais, limita a liberação de enzimas pró-osteoclastogênicas (JILKA, 2003).

Assim como a doença em si, os seus fatores de risco são multifatoriais. Idade, gênero, índice de massa corpórea (IMC), histórico familiar, sedentarismo, hormônios sexuais, consumo de álcool, tabagismo, deficiências nutricionais e vitamínicas, uso crônico de medicamentos (corticóides, lítio, anticonvulsivantes), doenças crônicas como diabetes, anorexia, mieloma múltiplo são alguns exemplos (RUSSEL, 2003). OP é mais comum em mulheres do que em homens, especialmente relacionada à menopausa. Em homens, hipogonadismo (produção deficiente de hormônios sexuais) também é associado à osteoporose (ANDERSON, 1992).

O tratamento da osteoporose tem como grande objetivo prevenir fraturas que, associadas à osteoporose, apresentam alto grau de morbidade e aumento nos níveis de mortalidade, sendo a de quadril a mais prevalente (HERNLUND *et al.*, 2013). O alvo, no tratamento, é inibir reabsorção óssea e manter ou aumentar a densidade do tecido duro. Existem medidas anti-reabsortivas, que agem especialmente na reabsorção do tecido ósseo, como cálcio, vitamina D, terapia hormonal, medicamentos como bisfosfonatos, ranelato de estrôncio, moduladores de estrógeno e calcitonina. Outra alternativa são os agentes anabólicos, estes agindo na fase de formação óssea, como o uso de hormônio da paratireóide (hPTH). Associada a estas medidas, inclui-se intervenções em riscos modificáveis como tabagismo, alcoolismo, sedentarismo e dieta (SAMBROOK; COOPER, 2006; HERNLUND *et al.*, 2013). Considerando-se ações medicamentosas, algumas drogas atuam não somente no tratamento, mas também na prevenção da doença, como os bisfosfonatos alendronato, etidronato, pamidronato, risedronato e ácido zoledrônico (HERNLUND *et al.*, 2013).; e o ranelato de estrôncio (DONOS *et al.*, 2015).

1.10. BISFOSFONATOS

Os bisfosfonatos (BF) são a classe de drogas mais usada para o tratamento e prevenção de osteoporose assim como para metástases ósseas, tendo em vista que muitos tipos de câncer causam hipercalcemia (excesso de cálcio circulante). O primeiro BF usado em humanos foi o Etidronato, prescrito para tratamento de fibrodisplasia ossificante progressiva e doença de Paget (SMITH *et al.*, 1971). Atualmente seu uso

também apresenta indicações específicas para outras doenças ósseas como Mieloma Múltiplo (MARX *et al.*, 2005; MHASKAR *et al.*, 2012). No princípio de sua aplicação, o objetivo era reduzir as áreas de mineralização óssea, porém ao longo dos anos, foram surgindo BF mais potentes na sua ação inibitória da reabsorção óssea sem a correspondente ação sobre a mineralização, conforme a dose administrada (RUSSEL 2007).

BF são análogos do pirofosfato, agindo na redução das atividades dos osteoclastos através da redução da diferenciação e maturação destas células além de induzir sua perda de função e morte celular, a chamada apoptose. Doses repetidas de BP provocam o seu acúmulo na matriz óssea tendo em vista que o fármaco tem afinidade por pirofosfato, que forma a hidroxiapatita, sendo esta o principal componente da matriz inorgânica do osso. O fármaco acumula-se nas áreas onde há maior atividade de remodelamento ósseo. Composto por átomos de fósforo e de carbono (P-C-P), a molécula de BF apresenta ligação com grupo OH e este, por sua vez, tem grande afinidade pela molécula de hidroxiapatita. Estabelecida a ligação entre a hidroxiapatita e o BF, esta caracteriza-se por ser estável e irreversível tendo em vista que o átomo de carbono presente no BF torna-o não hidrolisável (Fig. 1) (RUSSEL, 2007).

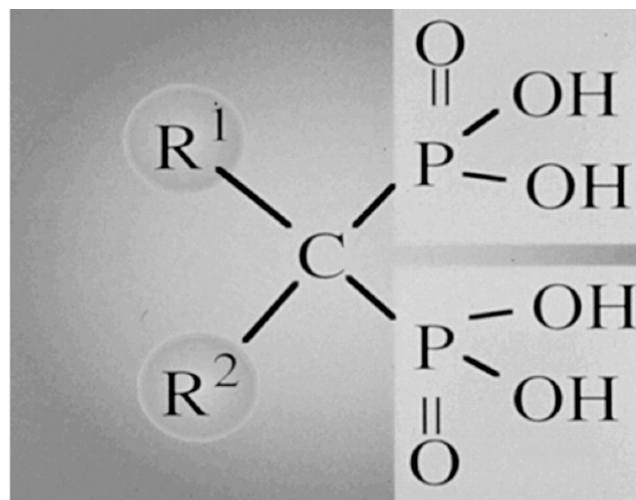


Fig.1 - Grupo OH apresenta afinidade por hidroxiapatita. O átomo de C é responsável pela resistência do BP à hidrólise, comprovando a sua resistência. A cadeia R² é onde o nitrogênio dos BF mais potentes está ligado ao C. (Russel 2007).

No evento de remodelamento ósseo, osteoclastos causam reabsorção óssea através de acidificação originada a partir de sua membrana rugosa e a quebra da matriz óssea extracelular através de enzimas proteolíticas, causando dissolução da hidroxiapatita. Quando BF está presente, este está ligado à hidroxiapatita, sendo que a dissolução desta resultará na liberação de BF, justificando, desta forma, a grande afinidade de BF por osteoclastos. Após, o BF é internalizado pela célula osteoclástica através de endocitose, pelos vacúolos intracelulares. Uma vez que o BF é ingerido, a atividade osteoclástica será comprometida pela ação citotóxica do fármaco, que inibirá a síntese de farnesil difosfato, uma enzima da síntese de colesterol que é necessária para a ativação dos receptores de proteínas trifosfato dos osteoclastos. Esta ação levará a célula a perder sua membrana extracelular rugosa, inativando a função fagocitária seguido da consequente desestruturação do citoesqueleto e apoptose, morte celular do osteoclasto, causando redução da reabsorção óssea (MARX, 2007; GRAHAM; RUSSEL, 2007). Somado a isso, existem evidências que os BF agem também na formação celular dos osteoclastos, visto que esta célula, multinucleada, origina-se a partir da fusão de células mononucleadas de origem hematopoiética. O fármaco atua prevenindo esta fusão, reduzindo os osteoclastos na sua origem (RUSSEL, 2007). Existem duas classes de BF: com e sem nitrogênio; podendo serem administrados via oral ou endovenosa (EV). Os BF, que contem átomo de nitrogênio em sua molécula, apresentam um modo de ação mais potente, causando maior comprometimento de osteoclastos (MARX, 2007; RUSSEL, 2007). Ácido zoledrônico (AZ) é um exemplo de BF nitrogenado, de uso EV. Indicado para tratamento e prevenção de metástases ósseas, osteoporose e mieloma múltiplo, é o mais potente dos BF (MARX, 2007; ZHU *et al.*, 2013). Alendronato é outro exemplo de BF nitrogenado, sendo prescrito para tratamento e prevenção de osteoporose. Etidronato, BF não nitrogenado, é reconhecido como menos potente, utilizado para calcificações hipertróficas (MARX, 2007). Os BF nitrogenados agem no metabolismo celular de maneira diferente dos não nitrogenados, o que os classifica como mais potentes. Sua ação ocorre sobre enzimas que regulam a síntese da via do mevalonato. Tal via regula as proteínas responsáveis pela produção de esteróides como colesterol e lipídios e comandam uma série de processos na função dos osteoclastos como a manutenção do

seu citoesqueleto, morfologia e membrana rugosa. Os BF agem na síntese da enzima farnesil pirofosfato, uma das responsáveis pela via do mevalonato, parecendo ser o que determinará o grau de potência do medicamento e a sua influência em causar paralização das atividades celulares dos osteoclastos (RUGGERO, 2007; MARX, 2007).

Estudos foram realizados testando o uso AZ no tratamento de superfícies de implantes, com relatos de melhora na densidade óssea local, assim como aumento no torque de remoção destes (PETER *et al.*, 2006; STADELMANN *et al.*, 2009). A administração sistêmica de AZ foi relacionada com a diminuição e prevenção da reabsorção de enxertos alógenos assim como aumento no volume ósseo em procedimentos de enxerto realizados em tíbias de ratos (ÅSTRAND *et al.*, 2006).

Com efeitos positivos sobre patologias ósseas, os bisfosfonatos, especialmente os nitrogenados, são prescritos mundialmente. A meia vida descrita do fármaco pode ser de até dez anos, portanto sua ação pode influenciar a cicatrização óssea por um longo período de tempo, mesmo após os pacientes terem suspenso o seu uso (RUSSELL, 2007). Com o passar do tempo, osteonecrose (ON) foi apontada como o principal efeito colateral do uso crônico da droga (MARX, 2007). A ocorrência de ON teve sua primeira publicação em 2003 (MARX, 2003). As principais complicações acontecem especialmente nos maxilares (MARX *et al.*, 2005; MARX, 2007; KHUL *et al.*, 2012), sendo mais frequente em mandíbula, após procedimentos cirúrgicos, em pacientes com histórico de uso de AZ, especialmente em tratamentos de câncer (RUGGIERO *et al.*, 2014). Uma série de relatos de caso estão publicados na literatura, tanto em mandíbula (GEGLER *et al.*, 2005) quanto em maxila (BUSETTI; POLIDO, 2008). É considerada ON de maxilares a presença persistente de tecido ósseo exposto, na cavidade oral, em um paciente que usou ou utiliza BP, sem histórico prévio de radiação na região maxilo-facial (YUEN *et al.*, 2014; KHAN *et al.*, 2015), sendo que a sua prevalência é de 0,12% para BF de uso oral e 7% em prescrições endovenosas (MARX, 2003).

1.11. EFEITOS DA OSTEOPOROSE NA ROG

Muito pouco é conhecido sobre a habilidade do osso comprometido pela

osteoporose de regenerar, em diferentes situações clínicas, considerando-se os mecanismos biológicos envolvidos em ROG (ERDOĞAN *et al.*, 2007). Dados sugerem que a osteoporose pode interferir em casos de regeneração óssea, na osseointegração de implantes (FINI *et al.*, 2004; TSOLAKIS *et al.*, 2009; DONOS; CALCIOLARI, 2014), na cicatrização de fraturas (NAMKUNG-MATTHAI *et al.*, 2001) e na cicatrização de enxertos ósseos (KIM *et al.*, 2004; LUIZE *et al.*, 2008).

Estudos demonstraram uma correlação entre DMO da mandíbula com a DMO de demais áreas do esqueleto (HOMER; DEVLIN, 1998; JEFFCOAT *et al.*, 2000; JEFFCOAT *et al.*, 2005). Correlações positivas foram apontadas entre DMO mandibular e a DMO da cabeça do fêmur (KLEMETTI *et al.*, 1993).

Estudos *in vitro* assim como pré-clínicos compararam os potenciais regenerativos entre situações com osso saudável e osteoporótico. Estes estudos apontaram diferenças na taxa de proliferação de osteoblastos, de células mesenquimais indiferenciadas, de produção de colágeno do tipo I, osteocalcina (proteína não colagenosa responsável pela mineralização e estabilização dos íons de cálcio através da fixação do cálcio e da hidroxiapatita na matriz extracelular), fator de necrose tumoral beta (TFG- β) e IL6 entre células humanas originadas de indivíduos saudáveis comparadas com aquelas de osteoporóticos (JILKA *et al.*, 1998; TORICELLI *et al.*, 2002; CHARATCHAROENWITTHAYA *et al.*, 2007).

O modelo animal mais utilizado para análise da fisiopatologia da osteoporose é o estudo em ratos ovariectomizados (KALU, 1991). A confiabilidade deste modelo em avaliar mudanças esqueléticas causadas pela osteoporose foi demonstrada previamente (EJIRI *et al.*, 2008; MARDAS *et al.*, 2011). Porém deve-se levar em consideração que modelos em animais apresentam uma série de diferenças para humanos em termos de fisiologia óssea e remodelamento, sendo que não se devem extrapolar os dados dos estudos nos animais para o uso em humanos (RETZEPI; DONOS, 2010; MARDAS *et al.*, 2011; STAVROPOULOS *et al.*, 2015).

Ovariectomia em ratos, associada a uma dieta hipocálcica, demonstrou associação positiva na redução de DMO, tanto com situações de alterações em cicatrização (KUBO *et al.*, 1999) quanto no aumento da incidência de fraturas (NAMKUNG-MATTHAI *et al.*, 2001). Estudos pré-clínicos adotando o mesmo modelo

também demonstraram uma associação do efeito negativo da osteoporose na cicatrização de enxertos ósseos (FINI *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2004) e de procedimentos de ROG (MARDAS *et al.*, 2011).

Muito poucos estudos clínicos demonstraram associação entre regeneração e osteoporose. Hildebrand *et al.* (1994) analisou o sucesso e complicações de enxertos ósseos em 17 pacientes. DMO de todos os indivíduos foram avaliadas com DEXA. Os autores concluíram que baixos níveis de DMO podem estar associados com o aumento nos níveis de complicações (30%). Efeitos negativos da osteoporose também foram associados à redução da taxa de sobrevivência de implantes feitos em áreas enxertadas (SCHILEPHAKE *et al.*, 1997; KRAMER *et al.*, 1999). Outros estudos, porém, não detectaram diferenças entre pacientes com osteoporose comparados com indivíduos saudáveis, em termos de sobrevivência de implantes (BECKER *et al.*, 2000; VAN STEENBERGHE *et al.*, 2002). Estudos relataram que apesar de traços de maior índice de complicações, pacientes osteoporóticos não estariam contra indicados a receberem implantes dentários (MOY *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, o número de pacientes idosos que procuram reabilitações implanto-suportadas vem crescendo exponencialmente, o que leva à conseqüente demanda de procedimentos regenerativos para reconstruções maxilares (BECKER *et al.*, 2015). Os profissionais da saúde, ao tratar esta população, lidam não somente com pacientes cujo metabolismo ósseo pode apresentar alterações patológicas, mas também com indivíduos que estão medicados com o objetivo de tratar ou prevenir tais distúrbios e cuja cicatrização óssea pode apresentar-se de maneira diferenciada. Sendo assim, é crucial buscar-se o aprofundamento do conhecimento associando procedimentos regenerativos com a doença osteoporose assim como a influência do seu tratamento, com o uso cada vez mais frequente de bisfosfonatos, sobre os resultados da ROG, visando à qualidade de vida da população mundial.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar ROG associada ao uso de membranas não reabsorvíveis instaladas em defeitos na calvária de ratas saudáveis, osteoporóticas e osteoporóticas recebendo tratamento com ácido zoledrônico.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar qualitativamente, por meio de análise histológica e quantitativamente, por análise histomorfométrica, a influência da osteoporose durante os estágios iniciais e tardios de formação de novo osso com ou sem o uso de barreiras (membranas) de politetrafluoretileno para ROG.
- Avaliar qualitativamente, por meio de análise histológica e quantitativamente, por análise histomorfométrica, a influência da administração de um bisfosfonato (ácido zoledrônico), durante os estágios iniciais e tardios da formação de novo osso com ou sem o uso de membranas não reabsorvíveis de politetrafluoretileno para ROG.

3. ARTIGO 1

Guided bone regeneration in osteoporotic conditions following treatment with zoledronic acid

Nikos Mardas ¹

Juliano Buseti ²

José Antonio Poli de Figueiredo ³

Luis André Mezzomo ⁴

Roberta Kochenborger Scarparo ⁵

Nikolaos Donos ⁶

Key words: Guided Bone Regeneration. Osteoporosis. Zoledronic acid. Rats.

¹ Senior Clinical Lecturer, Honorary Consultant, Oral Adult Health, Bart's & The London School of Dentistry, Queen Mary University, London, UK.

² PhD Student, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Dental School

³Head of Clinical Department, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Dental School

⁴Assistant Professor, Department of Dentistry, Federal University of Santa Catarina

⁵Adjunct Professor, Department of Conservative Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Dental School

⁶ Professor, Head and Chair, Periodontology Unit, UCL, Eastman Dental Institute, Head Clinical Oral Research Center, QMUL

Abstract

Objectives: To evaluate new bone formation in calvarial critical size defects (CSD) under d-PTFE membranes for Guided Bone Regeneration (GBR) in healthy, osteoporotic and osteoporotic treated with Zoledronic Acid (ZA) rats.

Methods: Forty-eight, female, 6-month old Wistar rats were included in the study. Osteoporosis was induced by ovariectomy (OVX) and calcium-deficient diet in 32 rats. Sixteen OVX rats were treated with a single dose of Zoledronic Acid (ZA) (OZ), while

16 OVX rats received no treatment (O). The remaining 16 rats were sham-operated and used as healthy controls (C). At 6 weeks following osteoporosis induction, two 5.0 mm CSD were created in the parietal bones and one of them was treated with a double microporous Teflon membrane. The healing periods were 30 and 60 days. New bone formation (NB) was assessed by qualitative and quantitative histological analysis

Results: After 30 days of healing, NB (mean % (\pm standard deviation)) was 78.9%(\pm 21.0), 93.1 % (\pm 9.6) and 84.2 % (\pm 26.9) in the membrane treated defects and 18.8% (\pm 24.1), 27.2 % (\pm 7.9) and 31.0% (\pm 36.8) in the empty defects of group O, OZ and C respectively. After 60 days of healing, NB was 78.3 % (\pm 14.4), 95.8% (\pm 9.0) and 90.1 % (26.1) in the membrane treated defects and 10.8 % (17.4), 51.6% (39.5) and 15.7 % (12.1) in the empty defects of group O, OZ and C respectively. Hierarchical analysis of variance showed that treatment with Zoledronic Acid ($p=0.001$) and the use of membrane ($p=0.000$) significantly increased new bone formation while presence of osteoporosis may have reduced new bone formation ($p=0,028$).

Conclusion: Dense PTFE membranes for GBR promote bone healing in osteoporotic and healthy rats. Treatment of osteoporosis with Zoledronic Acid may further improve new bone formation in osteoporotic conditions.

Introduction

The Guided Bone Regeneration (GBR) principle is based on the protection of a secluded space in an osseous defect by a barrier membrane in order to impede the proliferation of connective and epithelial tissue into the defect, allowing osteogenic cells emanating from the existent bone surfaces or the newly formed vasculature to repopulate the defect and promote new bone formation (Dahlin et al. 1988, Schenk et al. 1994 Retzepi and Donos 2010, Donos et al. 2015). Several preclinical studies have demonstrated predictable bone regeneration following GBR in various types of osseous defects and animal models (Donos et al. 2015, Stavropoulos et al. 2015). In a clinical level, resorbable and non-resorbable barriers in combination or not with bone grafts and substitutes, have been suggested for the augmentation of atrophic alveolar ridges prior

to implant placement (Von Arx and Buser 2006, Urban et al. 2013), for the management of dehiscence and fenestration defects during implant placement (Buser et al. 2013, Jung et al. 2013, Donos et al. 2008), for alveolar ridge preservation (Mardas et al. 2010, Horvath et al. 2013, Mardas et al. 2015,) and the treatment of peri-implantitis (Schwarz et al. 2009, Chan et al. 2014). These procedures are currently used in the every day clinical practice with various degrees of predictability due to a variety of patient or site related factors (Donos et al. 2008, Horvath et al. 2013, Chan et al. 2014).

Following the establishment of osseointegration and guided bone regeneration, the number of elderly patients seeking treatment with bone augmentation procedures in relation to rehabilitation with implant supported prosthesis has been increased in the recent years (Becker et al. 2015). At the same time, an increased number of these patients are expected to suffer from one or more of chronic metabolic diseases, like diabetes or osteoporosis, which may affect bone healing (U.S department of Health and Human services 2014).

Osteoporosis is a common, metabolic disease characterized by reduced bone mass and changes in bone microarchitecture, resulting in increased risk for fractures (Jilka et al. 2003). It is anticipated that 27.6 million people are suffering from osteoporosis in Europe in 2010, with a higher prevalence in post-menopausal Caucasian women (Hernlund et al. 2013). *In vitro* studies using osteoblasts from osteoporotic bone showed an impaired osteoblast development, activation and differentiation (Rodriguez et al. 2008, Kassem and Marie 2011, Benisch et al. 2012). Furthermore, the number of mesenchymal stem cells and anabolic cytokines such as TGF- β and IGF-1 in ageing osteoporotic animals was affected adversely, influencing bone metabolism (Jilka et al. 1998, Toricelli et al. 2002, Charatcharoenwitthaya et al. 2007). Data deriving mainly from preclinical studies (for review see Donos et al. 2015) and few clinical case control clinical studies have indicated that osteoporosis might influence negatively long bone fracture healing (Namkung-Matthai et al. 2001, Oliver et al. 2013) and the osseointegration of dental implants (Erdoğan et al. 2007; Fini et al. 2004; Tsolaki et al. 2009) or bone grafting procedures (Kim et al. 2004, Luize et al. 2008) and extraskeletal bone formation (Mardas et al. 2011) in the cranio-maxillo-facial area. However, other studies failed to associate osteopenia due to low estrogen levels

with significantly impaired osseous healing (Kubo et al. 1999, Zellin et al 2002, Vidigal et al 2009). Currently, there is limited evidence considering the regeneration capacity of osteoporotic patients to regenerate bone following various GBR procedures (Erdoğan et al, 2007).

Bisphosphonates are among the most widely prescribed drugs for the treatment of osteoporosis since they are able to disrupt osteoclast function and inhibit bone resorption, resulting in increased bone density and fewer fractures (Eriksen et al. 2014). Furthermore, *in vitro* studies showed that bisphosphonates might increase osteoblastic cells proliferation, stimulate osteoblastic differentiation and enhance mineralization (Bellido and Plotkin 2011). Due to their mode of action, it has been suggested that systemic or local administration may have a positive effect on osseointegration and treatment of periodontal disease (Borromeo et al. 2010) or reduce post-extraction dimensional changes in terms of horizontal bone width (Fischer et al. 2015).

Zoledronic acid (ZA) is a nitrogen containing, intravenously administered bisphosphonate. It is able to inhibit the synthesis of farnesyl diphosphate, an enzyme in the cholesterol synthesis path that is necessary for the formation of triphosphate-binding proteins, which are essential for osteoclast function and survival. Consequently, ZA inactivate osteoclasts, which go into apoptosis, resulting in reduced bone resorption (Graham & Russell 2007). Zoledronic acid has been used successfully for the prevention and treatment of osteoporosis, metastatic bone cancers and their resulting hypercalcemia, multiple myeloma, and other conditions that exhibit bone fragility due to excessive osteoclastic resorption (Serrano et al. 2007, Zhu et al. 2013). Moreover, local treatment of titanium implants surfaces with ZA has been reported to improve peri-implant bone density and removal torques (Peter et al. 2006, Stadelmann et al. 2009) while systemic administration prevented resorption of allograft and increased the retention of new formed bone into bone chambers placed in rat tibia (Åstrand et al. 2006). On the other hand, jawbone osteonecrosis following oral surgical procedures was increased in patients under treatment with intravenously administered bisphosphonates like ZA, especially when treated for metastatic bone cancers (Ruggiero et al 2014).

Based on the current evidence, a clear understanding of the bone healing process in osteoporotic conditions is crucial for applying predictable bone regenerative treatments in this type of patients, especially when they are under treatment with anti-resorptive drugs such as ZA. Therefore, this study proposed to evaluate new bone formation in a calvarial critical size defect model in healthy, osteoporotic and osteoporotic treated with Zoledronic Acid (ZA) rats following treatment with membranes for GBR.

Material and Methods

Experimental animal model

The research protocol was approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Dentistry (CCEFO), Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul and by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA). This research was conducted in accordance with prevailing ethical principles for the use of laboratory animals established by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) in an environment governed by the rules of the Arouca Act (No. 11.794, of October 8, 2008).

Forty-eight (48), female, white Wistar rats (*Rattus Norvegicus*), six months old, weighting between 260 and 320 g, with no injuries or congenital defects were used in the study.

Induction of osteoporosis-like conditions

Experimental osteoporosis was induced by ovariectomy (OVX) and calcium-deficient diet in 32 randomly selected rats using the method previously described by Shimizu et al. (2000). Sixteen rats were sham operated and served as controls. The following standard operative procedures for the animals' anaesthesia and welfare were performed before of each surgical session and during the first post-operative days: 1) Intra-peritoneal injection of a mixture of xylazine (20 mg / ml) at a dose of 0,05mL / 100g (ROMPUM®, Bayer SA - Animal Health, São Paulo, Brazil) and ketamine (50 mg / mL) 0.1 mL / 100 g (DOPALEN®, Agribrands, São Paulo, Brazil). 2) Intra-peritoneal injection

of Paracetamol at a dose of 50 mg / mL (1 mL / kg) (Tylenol Gotas®, Johnson & Johnson, SP, Brazil) every 4 h, for the first 24 post- surgical hours 3) Close inspection and follow-up of the animals during the first post-operative days for possible behavioural, neurological or physiological changes of toxicological or post-surgical trauma relevance.

Before the OVX, the rat's abdomen was shaved with an electric trimmer. Disposable sterile surgical drapes were used for the isolation of the surgical bench and different surgical instruments were used for each individual rat. Chlorhexidine digluconate 2% (Saneativo LTD, DF, Brazil) was used for antiseptis of the surgical area.

Following a longitudinal incision in the region below the last rib and next to the kidney, the skin and the muscles were incised; the ovary was identified and displayed. Haemostasis was secured by suturing the top of the fallopian tube with Vicryl 2-0 sutures (Ethicon, Somerville, USA) and the ovary, the surrounding fat, the oviduct and a small portion of the uterus were excised. The muscles and skin were then sutured. The same surgical procedure was performed bilaterally in each animal. The control rats were SHAM operated by only having their ovaries identified and surgically exposed then repositioned for subsequent suturing of the muscles and skin with 4-0 Vicryl (Ethicon, Somerville, USA).

The ovariectomized rats were fed with calcium and phosphorus deficient diet (0.1-0.2 % calcium and phosphorus \leq 1 %; Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, Brazil) and water *ad libitum* throughout the whole experimental period. At six weeks following OVX, 16 out of the 32 ovariectomized animals were treated with a single subcutaneous dose of 0.1mg/kg zoledronic acid (Zometa, Novartis, São Paulo, Brazil). The induction of osteopenia was confirmed by evaluating total and femoral bone mass density by means of DEXA in 4 osteoporotic and 4 healthy animals and histologically in all the specimens. At seven weeks following OVX, the animals underwent the experimental GBR surgery.

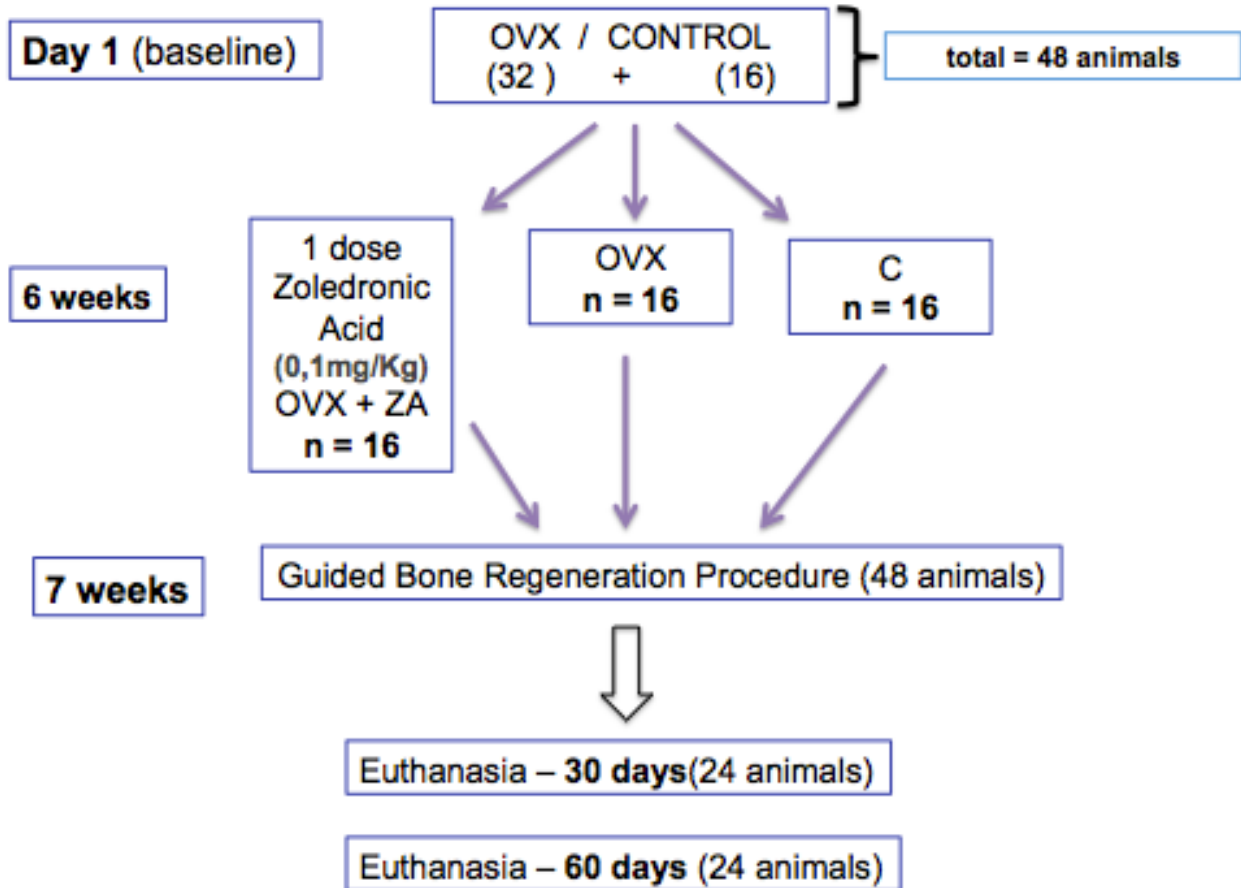
Experimental GBR surgical procedure

The same experimental surgical procedure was performed in all animals (both

OVX and sham operated). Following a linear coronal incision in the middle line of the calvarium, a full thickness flap was elevated and the cranial vertex was exposed. Two standardized, full thickness, 5.0 mm in diameter circular defects were made in the center of each parietal bone using a trephine drill with a 5.0 mm internal diameter (Neodent, Curitiba, Brazil) (Figure 1). The trephine was used under constant cooling with 0.9% saline solution, allowing the preparation of the bone defect with rupture of internal and external cortical of the skull, without damaging the dura mater. The right side defect was treated with a double layer, non-resorbable; PTFE membrane (Cytoplast®, Regentex GBR-200, Osteogenics Biomedicals, Lubbock, EUA) (Figure 2) for GBR and the contralateral left defect was kept empty and used as control. The first layer of the membrane was placed under the parietal bone in the defect area, in contact with the underlying dura mater and the second layer of the membrane was placed at the outer surface of the defect extending at least 3 mm beyond the borders of the defect. The soft tissues were repositioned, and the overlying muscles and periosteum were sutured with simple interrupted sutures (Vicryl 5-0, Ethicon, Somerville, USA) in an attempt to cover as much as possible of the defect and the membrane. The skin was sutured in a single plane, using continuous suspended sutures (Vicryl 4-0, Ethicon, Somerville, USA). The animals were placed in prone position, on their corresponding cages for recovery from anaesthesia. The animals were euthanized with an overdose of isoflurane (Biochemico, Rio de Janeiro, Brazil) at 30 and 60 days after the experimental GBR procedure. Based on the osteoporosis status, zoledronic acid treatment and observation periods were allocated in the following 6 groups (8 animals / group):

1. *O30d*: OVX, hypocalcic diet; healing 30 days.
2. *O60d*: OVX, hypocalcic diet; healing 60 days.
3. *OZ30d*: OVX, hypocalcic diet, zoledronic acid; healing 30 days.
4. *OZ60d*: OVX, hypocalcic diet, zoledronic acid; healing 60 days.
5. *C30d*: sham operated, normal diet; healing 30 days.
6. *C60d*: sham operated, normal diet; healing 60 days.

Research timetable:



Histological procedures

Following the euthanasia of the animals, their calvarial vertexes were removed and the areas of interest dissected and fixed in 10% neutral buffered formalin for 48 hours. Then, the specimens were rinsed in running tap water, trimmed, decalcified in 17% EDTA, dehydrated in ascending concentrations of ethanol (50%, 70% and 100%) and embedded in paraffin. Anterior-posterior serial sections were cut with the microtome set at 7 μm . The specimens were stained with haematoxylin and eosin and 3 consecutive sections, 100 μm apart, representing the central area of each calvarial defect were selected for histological analysis. The specimens were evaluated with x4, x10 and x20 magnifications at a stereomicroscope (SZH10 Research Stereo, Olympus, Japan). The image was captured in a Moticam 5, 5.0MP camera (Hong Kong, China), using Motic plus system (Hong Kong, China) and transferred using an image analysis

software (J image, www.nih.gov; USA).

Histomorphometric measurements and semi- quantitative analysis

The cross-sectional area of the newly formed bone (trabecular bone and marrow spaces) and the original defect area were measured on the three central sections previously described in mm². Newly formed bone was expressed as a percentage of the total defect area. All measurements were performed by the same calibrated examiner (JB). The reproducibility of the measurements was tested by carrying out duplicate measurements in 3 specimens from each group, at two different time points, one week apart. The results of the two recordings were then statistically analysed with the Wilcoxon test for paired observations. No statistical significant differences were found between the two recordings ($p < 0.05$).

A semi-quantitative analysis evaluating new bone formation and defect closure was performed based on the following ranking:

-/- : No new bone formation, no defect closure

+/- : Minimal new bone formation, no defect closure

++/- : Significant new bone formation, no defect closure

++/+ : Significant new bone formation, defect closure

+++/+ : New bone formation outside the original envelop, defect closure

Statistical analysis

Differences between means for the groups (O, OZ and C), the use of GBR membrane or not and the time periods (30 and 60 days) were assessed by performing a hierarchical analysis of variance (ANOVA) for each variable, with rats nested within periods within groups and crossed with the use of membranes or not. The assumptions for normal distribution of the data underlying the ANOVA were checked by a study of the residuals. If the assumptions were not fulfilled, a logarithmic transformation was applied

to the data. When a statistically significant difference between the group means was indicated in the ANOVA, a post hoc Bonferroni test was used to determine which group means differed significantly. A result was considered statistically significant if $p < 0.05$.

Results

All the animals included in the study survived the whole experimental period. Their healing was uneventful with no signs of post-operative infection or other complications. However, one or two specimens in each group were not evaluated histologically due to technical reasons (Table 1).

The combination of OVX and low-calcium diet resulted in a significant decrease in both skeletal and femoral bone density in 3 out of the 4 rats evaluated in contrast to sham-operated, healthy rats where both skeletal and femoral bone density was increased (data not presented). In addition to that, the calvarial bone in the OVX animals in O group presented with significant morphological differences in comparison to that of the healthy, sham-operated rats in group C. Thinner cortical bone plates and trabeculae characterized with reduced trabecular connectivity and micro-fractures, as well as larger marrow spaces populated by high number of fat cells were observed in the animals of the O group (Fig. 3a & 3b)

Semi-Quantitative Analysis

Untreated control defects

At 30 days of healing, in the control untreated defects, the majority of the defect area was occupied by connective tissue covered with epithelial and muscle tissues in all the groups (Fig 4a, 4b, 4c). Complete defect closure was not observed in any of the specimens in any group (Table 1). All the specimens in the OZ group presented with some new bone formation but 2 specimens in the O and C group presented with no new bone formation at all. However, significant new bone formation originating from the margins of the defect had occurred in one specimen of the C and OZ group.

At 60 days of healing, complete defect closure was not observed in any of the

specimens in any group (Table 1 & Fig 5a, 5b, 5c). A limited amount of newly formed bone apposition from the border of the defects was observed in O and C group where dense connective tissue occupied the major part of the defects in these groups. On the contrary, a trend for increasing new bone formation in comparison to the early healing period was observed in the OZ group where in 3 out of the 7 evaluated specimens, significant new bone formation was observed with almost complete bone continuity between the margins of the defect in one of them (Fig 5c).

GBR treated defects

Significant new bone formation was observed in all the animals in all the GBR treated defects at both observation periods with the exception of one animal in the C group where after 60 days of healing the new bone formation was limited in the margins of the defect (Table 1).

At 30 days of healing, complete defect closure was observed in all 6 sham-operated animals and in 4 out of the 6 animals evaluated in the O and OZ groups (Table 1). In some specimens, new bone formation was extending outside the original contour of the calvarium, resulting in an increased thickness of the calvarial bone in the area of the defect (Fig 6c). A thin, periosteum like, zone of dense connective tissue interposed between the newly formed bone and the PTFE membranes that were able to preserve the defect space in most of the specimens. The newly formed bone in the sham-operated animals presented with high level of remodelling, thicker trabeculae and limited marrow spaces in between the two thick cortical plates (Fig 6a). On the contrary the newly formed bone in the OVX animals was characterized with extensive marrow spaces, rich in adipocytes and thinner cortical plates (Fig 6b). In the OVX treated with ZA animals, the newly formed bone presented with thicker trabeculae and less extended marrow spaces in comparison to the untreated OVX animals without however presenting a bone density similar to that of the sham-operated healthy animals (Fig. 6c).

A similar healing pattern and histological characteristics were observed in the experimental groups after 60 days of healing. Large marrow spaces with increased number of adipocytes and thinner trabeculae were observed in O and OZ groups in comparison to the healthy animals in C group (Fig 7a, 7b, 7c). All the defects in the OZ

group presented with complete defect closure and in 5 of them new bone formation was extending beyond the original contour of the calvarial vortex in the area of the defect. On the contrary, 3 out of 6 and 2 out of 7 defects in the O and C group respectively failed to achieve complete closure (Table 1).

Histometric Analysis

The results of the histometric analysis are presented in Table 2.

After 30 days of healing, the average newly formed bone in the empty defects was $18.8\% \pm 24.1$, $27.1\% \pm 7.9$ and $31.0\% \pm 38.8$ of the original defect area in groups O, OZ and C respectively. After 60 days of healing, the average newly formed bone in the empty defects was reduced to $10.8\% \pm 17.4$ and $15.7\% \pm 12.1$ of the original defect area in group O and C respectively but increased up to $51.6\% \pm 39.4$ in the OVX treated with zoledronic acid animals.

After 30 days of healing, the average newly formed bone in the membrane-protected defects was $78.9\% \pm 21.0$, $93.1\% \pm 9.3$ and $84.2\% \pm 26.9$ of the original defect area in groups O, OZ and C respectively. After 60 days of healing, the newly formed bone in the same defects averaged $78.3\% \pm 14.4$, $95.8\% \pm 9.0$ and $90.1\% \pm 26.1$ of the original defect area in O, OZ and C respectively.

The results of the hierarchical ANOVA are presented in Table 3. A logarithmic transformation of the newly formed bone percentage was made in order to comply with the assumptions for normal distribution underlying the ANOVA. The ANOVA showed that the use of membrane ($p=0.000$) and the condition (OVX, treatment of OVX with ZA or sham operation, $p=0.001$) had a statistically significant effect on the percentage of new bone formation in the defect area. This effect was always independent of the observation period and group. In all experimental periods and in all groups (O, OZ and C) the average percentage of new bone formation was higher in the membrane treated defects (Table 2). The average percentage of new bone formation in both empty and membrane treated defects was higher in the OZ animals in comparison to the animals in the other two groups with the exception of animals in C group that were presented with more new bone formation in the empty untreated defects at 30 days of healing.

The Bonferroni test for multiple comparisons between the groups showed that we should anticipate approximately 4.1% less new bone formation in the ovariectomized animals in comparison to the ovariectomized animals treated with zoledronic acid ($p=0.001$) and 2.8% less new bone formation in comparison to the healthy control animals ($p=0.028$) (Table 4). The difference in new bone formation between OZ and C animals however, was not statistically significant ($p=0.677$).

Discussion

Due to the increase in life expectancy, dentists involved in complex implant rehabilitation and bone regenerative therapies will increasingly treat patients who are suffering from osteoporosis and for this reason are under medications that potentially could influence bone healing. Currently, the effectiveness of GBR remains unknown in these patients, especially when bisphosphonate therapy is subscribed for increasing their bone density (Erdoğan et al, 2007; Tsolaki et al, 2009). Besides their obvious limitations, preclinical animal models, where osteoporotic like conditions could be induced in a reproducible manner may offer an initial understanding of bone healing processes and an estimation of the potential effect or failure risk following bisphosphonate treatment (Turner et al. 2001, Donos et al. 2015). Therefore, the present study used a CSD model in rats to evaluate to what extent osteoporosis and its treatment with zoledronic acid has influenced bone regeneration following the application of GBR.

The calvarial CSD in the rat has been extensively used as a proof of principle model for bone regeneration in relation to different biomaterials including barriers for GBR (Donos et al. 2015, Stavropoulos et al. 2015). According to a recent systematic review, calvarial defects with a diameter of 5.0 mm can be considered as CSDs in rats (Vajgel et al., 2014). This was confirmed in the present research where complete closure of the untreated defects was not observed in any of the experimental animals in all 3 groups at either 30 or 60 days of healing indicating that the 5.0 mm trephine parietal defect used fulfilled the criteria of a CSD, This is also in agreement with previous studies using similar defects in rat calvariae (Mardas et al. 2002, Donos et al. 2004, 2011, Stavropoulos et al. 2015).

In the present study, a dense, microporous PTFE membrane for GBR was used for the treatment of the calvarial defects and resulted in significantly more new bone formation than what was observed in the untreated empty defects independent of the healing conditions. This result is in accordance with several, previous preclinical studies in healthy animals that evaluated the effect of resorbable and non-resorbable double barrier membranes (intra and extra cranial) on bone regeneration of calvarial defects (for review see Donos et al. 2015). In some cases the new bone formation at 60 days, resulted in an increase of the original thickness of the calvarium, which is consistent with our previous findings in this type of defects (Mardas et al. 2002 Donos et al. 2004, 2011).

Dense, non-expanded PTFE membranes (n-PTFE) were introduced as an alternative to the first generation of PTFE barrier for GBR, the expanded, (e-PTFE) Teflon barriers. The latter are characterised by increased surface macroporosity for better soft tissue integration and wound stability. On the other hand, e-PTFE membranes presented a higher risk for early infection and compromised regenerative outcomes due to their exposure in the oral environment (Simion et al.1994). This study confirmed previous preclinical reports that n-PTFE barriers are biocompatible and support new bone formation in calvarial (Crump et al. 1996, Marouf & El-Guindi 2000) or other type of defects (for review see Carbonell et al. 2014). However, today there is limited evidence regarding the superiority of n-PTFE over e-PTFE membranes (Carbonell et al. 2014); therefore further research evaluating both types of barriers in different clinical scenarios is necessary to evaluate the effect of membrane macroporosity and density on new bone formation in healthy and compromised healing conditions.

Clinical case series and cohort studies reported increased complication rates following bone augmentation procedures or the placement of dental implants in osteoporotic patients without on the other hand, post-menopausal osteoporosis to be considered as a contraindication for these procedures (Erdoğan et al, 2007; Tsolaki et al, 2009). In addition, preclinical experimental studies have shown decreased or delayed osseous healing in long bone fractures (Namkung-Matthai et al, 2001, Oliver et al. 2013), following bone grafting (Kim et al, 2004), mandibular augmentation (Luize et al,

2008) or extra-skeletal calvarial bone formation under hydrophobic titanium domes (Mardas et al. 20011) in ovariectomized animals. Similarly, the current study indicated a moderate but significant negative effect of osteoporosis on new bone formation (Table 4). New bone formation in OVX animals was reduced in GBR treated and untreated empty defects at both observation periods when compared to healthy, sham-operated animals (Table 2). Moreover, the newly formed bone in GBR treated defects in the OVX animals presented significant qualitative differences to that in the healthy animals, since it was characterized by larger and richer in adipocytes marrow spaces, and thinner cortical plates. In contrast to our findings, other studies failed to associate hypogonadism induced osteopenia with impaired healing in long bone fractures, (Kubo et al. (1999) or following bone grafting (Oberg et al. 2003, Nascimento et al (2009). Several reasons may account for the above-mentioned conflicting results such as the choice of the animal model (Turner 2001, Egermann et al. 2005), the age, skeletal size and time after OVX (Glösel et al 2010, Lelovas et al. 2008, Francisco et al. 2011), the osteoporosis induction method (Egermann et al. 2005, Donos et al. 2015), the type, dimensions and location of the defects as well as the osseous healing evaluation methodology (Glösel et al 2010).

In the present study, experimental osteoporosis was induced in 6-month-old female rats by bilateral OVX and the administration of a calcium-deficient diet. A 7 week-period was allowed between the OVX and the experimental GBR operation. The selection of this model was based on the following evidence: a) the ovariectomized (OVX) female rat is a reproducible and widely used model that is recommended by FDA for bone research in post-menopausal osteoporosis (Thompson et al. 1995, Turner 2001, Egermann et al. 2005) b) 6 month-old OVX rats have shown better osteoporotic response in comparison to younger animals (Francisco et al 2001, Lelovas et al. 2008) c) the combination of OVX and a calcium deficient diet is superior to OVX alone for inducing osteoporotic changes because the addition of low calcium diet induces bone loss both in the cortical and cancellous bone, while oestrogen deficiency exerts an effect mainly limited to cancellous bone (Shen et al. 1995). The induction of osteoporosis, in the present study, was confirmed by DEXA measurements and the characteristic for osteoporosis morphological changes; trabecular thinning, trabecular micro-fractures,

reduction in trabecular connectivity and enlargement of marrow spaces with an increase in the volume of adipose tissue (Verma et al. 2002, Lelovas et al. 2008).

An interesting finding of this study was the observation that treatment of osteoporosis with Zoledronic Acid might further improve new bone formation in osteoporotic conditions. New bone formation in GBR treated defects was higher in the OZ animals in comparison to the animals in the other two groups at both 30 and 60 days of healing (Table 2) and the Bonferroni test for multiple comparisons between the groups showed that we should anticipate significantly more new bone formation in OVX animals treated with zoledronic acid than in the OVX animals (Table 4). Furthermore, the use of a Zoledronic acid mediated the morphologic changes of the newly formed bone in the osteoporotic animals by increasing trabecular thickness and decreasing marrow spaces. Similar to our results, other studies have also reported a positive effect of Zoledronic acid on bone formation. Local treatment of titanium implants surfaces with ZA improved peri-implant bone density and removal torques (Peter et al. 2006, Stadelmann et al. 2009) while systemic ZA administration prevented the resorption of an allograft and increased the retention of newly formed bone into bone chambers placed in rat tibia (Åstrand et al. 2006). A possible explanation for these preclinical reports could not be limited on the inhibitory activity of bisphosphonates on osteoclasts. *In vitro* and *in vivo* studies provided evidence that bisphosphonates may increase osteoblastic cells proliferation, decrease their apoptosis, stimulate osteoblastic differentiation and enhance mineralization (Bellido and Plotkin 2011). Furthermore, a recent study demonstrated that a single low dose of ZA reduced adipocyte-related gene expression and reversed the marrow adipogenesis occurring during oestrogen deficiency in an OVX rat model (Li et al. 2014a). Considering the fact that when bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into adipocytes, and not into osteoblasts, intracellular osteogenic signals that affect bone formation and remodelling (runt-related transcription factor 2, osterix, and beta-catenin) are suppressed, the potential anti-adipocyte genesis action of ZA could have contributed to its bone anabolic effect observed in the present study (Muruganandan et al. 2009). However, we were not able to assess whether ZA has a similar anabolic effect in healthy healing conditions since a control group where this medication was administered in healthy sham operated animals was not included in the

present study.

Osteonecrosis of the jaw (ONJ) constitutes a serious clinical concern considering the increased number of patients who take bisphosphonates and are undergone oral surgery. ONJ has been reported in 0.7% - 6.7% of cancer patients that are usually prescribed with 4mg / every 3 weeks of ZA intravenously. In cancer patients treated with ZA, the relative risk for ONJ was estimated to be 50-100 times higher than cancer patients treated with placebo. On the other hand, only 0.017- 0.04% of osteoporotic patients under treatment with intravenously administered ZA (5mg/ year) presented with osteonecrosis and the risk for ONJ was similar to that in osteoporotic patients treated with placebo (Ruggiero et al 2014). In the present study, post-operative healing in all the OVX animals treated with ZA was uneventful and no signs of osteonecrosis or similar healing complications were observed. Interestingly enough, other studies have reported significantly compromised post-extraction osseous healing and areas of exposed bone or sequestrum formation following several high-dose intravenous administrations of bisphosphonates in rats (Hikita et al. 2009) and in dogs (Allen et al. 2010). Moreover, ONJ like lesions were induced in a reproducible manner following high weekly doses of ZA in healthy (Aguirre et al. 2012, Silva et al. 2015) and OVX rats (Li et al. 2014b). The duration, the dosage and the method of ZA administration could influence the rate of osteonecrosis in rats (Silva et al. 2015) and in humans (Ruggiero et al 2014). Therefore, a possible explanation for the absence of osteonecrosis or any other compromised osseous healing in the present study could be that, in contrast to the previously mentioned studies, a single, subcutaneous, low dose (0.1mg/kg) of ZA has been administered in the calvaria of osteoporotic rats (Silva et al. 2015, Li et al 2014a).

In conclusion, the present study demonstrated that dense PTFE membranes for GBR are able to promote bone healing of critical size calvarial defects in both osteoporotic and healthy rats. Within the limitations of the specific study we showed that treatment of osteoporosis with a single dose of Zoledronic Acid might further improve new bone formation in osteoporotic conditions. Although rat osteoporotic models may simulate human osteoporosis, data derived from this type of animal models should be used with caution and not transferred directly to clinical situation because of anatomical and other differences like the lack of Haversian systems in their cortical bone, lack of

multicellular remodelling activity, bone composition and metabolism (Turner 2001, Lelovas et al. 2008). The possible anabolic effect of a single low dose of ZA before bone augmentation procedures should be further evaluated in future research in bigger animals before clinical application.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the contribution of Dr Mario Bernardes Wagner in the statistical analysis of the data.

References

Allen, M.R., Kubek, D.J. & Burr, D.B (2010) Cancer treatment dosing regimens of zoledronic acid result in near-complete suppression of mandible intracortical bone remodeling in beagle dogs. *Journal of Bone Mineral Research* **25**:98–105.

Aguirre, J.I., Akhter, M.P., Kimmel, D.B., Pingel, J.E., Williams, A., Jorgensen, M., Kesavalu, L. & Wronski, T.J. (2012) Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in rice rats (*Oryzomys palustris*) with periodontitis. *Journal of Bone Mineral Research* **27**:2130-2143.

Åstrand, O., Kajsa-Harding, A., Aspenberg, P. & Tägil*, M (2006) Systemic zoledronate treatment both prevents resorption of allograft bone and increases the retention of new formed bone during revascularization and remodelling. A bone chamber study in rats. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2006, **7**:63.

Becker, W., Hujoel, P., Becker, B.E. & Wöhrle, P. (2015) Dental Implants in an Aged Population: Evaluation of Periodontal Health, Bone Loss, Implant Survival, and Quality of Life. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* doi: 10.1111/cid.12340. [Epub ahead of print]

Bellido, T. & Plotkin, L.I. (2011) Novel actions of bisphosphonates in bone: Preservation

of osteoblast and osteocyte viability *Bone* **49**: 50–55.

Benisch, P., Schilling, T., Klein-Hitpass, L., Frey, S.P., Seefried, L., Raaijmakers, N. et al. (2012) The transcriptional profile of mesenchymal stem cell populations in primary osteoporosis is distinct and shows overexpression of osteogenic inhibitors. *PLoS One* **7**(9):e45142.

Borromeo, G.L., Tsao, C.E., Darby, I.B. & Ebeling, P.R. (2010). A review of the clinical implications of bisphosphonates in dentistry. *Australian Dental Journal* **56**: 2–9.

Buser, D., Chappuis, V., Bornstein, M., Wittneben, J.G., Frei, M. & Belser, U.C. (2013) Long-term stability of contour augmentation with early implant placement following single tooth extraction in the esthetic zone: a prospective, cross-sectional study in 41 patients with a 5- to 9-year follow-up. *Journal of Periodontology* **84**(11):1 517-1127.

Carbonell, J.M., Martín, I.S., Santos, A., Pujol, A., Sanz-Moliner, J.D. & Nart, J (2014) High-density polytetrafluoroethylene membranes in guided bone and tissue regeneration procedures: a literature review. *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery* **43**: 75–84.

Chan, H.L., Lin, G.H., Suarez, F., MacEachern, M. & Wang, H.L. (2014) Surgical management of peri-implantitis: a systematic review and meta-analysis of treatment outcomes. *Journal of Periodontology* **85**:1027-1041.

Charatcharoenwitthaya N., Khosla S., Atkinson E.J., McCready LK, Riggs BL (2007). Effect of blockade of TNF-alpha and interleukin-1 action on bone resorption in early postmenopausal women. *Journal of Bone Mineral Research* **22**(5): 724-729.

Crump, T.B., Rivera-Hidalgo, F., Harrison, J.W., Williams, F.E. & Guo, I.Y. (1996) Influence of three membrane types on healing of bone defects. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontology* **82**: 365–374.

Dahlin, C., Linde, A., Gottlow, J. & Nyman, S. (1988) Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plastic and reconstructive surgery* **81**(5): 672-676.

Donos, N., Lang, N.P., Karoussis, I.K., Bosshardt, D., Tonetti, M. & Kostopoulos L. (2004) Effect of GBR in combination with deproteinized bovine bone mineral and/or enamel matrix proteins on the healing of critical size defects. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 101-111.

Donos, N., Mardas, N. & Chadha, V. (2008) Clinical outcomes of implants following lateral bone augmentation: systematic assessment of available options (barrier membranes, bone grafts, split osteotomy). *Journal of Clinical Periodontology* **35(8 Suppl)**:173-202.

Donos, N., Graziani, F., Mardas, N. & Kostopoulos, L. (2011) The use of human hypertrophic chondrocytes extracellular matrix for the treatment of critical-size defects in rats. *Clinical Oral Implants Research* **22**:1346-1353.

Donos, N., Dereka, X., Mardas, N. (2015) Experimental models for guided bone regeneration in healthy and medically compromised conditions. *Periodontology 2000* **68**: 99-121.

Egermann, M., Goldhahn, J. & Schneider E. (2005) Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporosis International* **16 (Suppl. 2)**: S129–S138.

Erdogân, O., Shafer, D.M., Taxelm P. & Freilich. M.A. (2007) A review of the association between osteoporosis and alveolar ridge augmentation. *Oral surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* **104**: 738.e1-738.e13.

Eriksen, E.F., Díez-Pérez, A. & Boonen, S. (2014) Update on long-term treatment with bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis: a systematic review. *Bone* **58**: 126–135.

Fini, M., Giavaresi, G., Torricelli, P., Borsarim V., Giardino, R., Nicolini, A. & Carpi, A. (2004) Osteoporosis and biomaterial osseointegration. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **58**: 487-93.

Fischer KR, Stavropoulos A, Calvo-Guirado JL, Schneider D, Fickl S. (2015) Influence of local administration of pamidronate on extraction socket healing – a histomorphometric

proof-of-principle pre-clinical in vivo evaluation. *Clinical Oral Implants Research* **26**:1135-1142.

Francisco, J.I., Yu, Y., Oliver, R.A. & Walsh, W.R. (2011) Relationship between age, skeletal site, and time post-ovariectomy on bone mineral and trabecular microarchitecture in rats. *Journal of Orthopaedic Research* **29**: 189-196.

Glösel, B., Kuchler, U., Watzek, G. & Gruber, R. (2010) Review of dental implant rat research models simulating osteoporosis or diabetes. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*. **25**: 516-524.

Graham, R. & Russell, G. (2007) Bisphosphonates: Mode of Action and Pharmacology *Paediatrics* **119 (S2)**: S150 - S162.

Hikita, H., Miyazawa, K., Tabuchi, M., Kimura, M., Goto, S. (2009) Bisphosphonate administration prior to tooth extraction delays initial healing of the extraction socket in rats. *Journal of Bone Mineral Metabolism* **27**: 663–672.

Horvath, A., Mardas, N., Mezzomo, L. A., Needleman, I. G. & Donos, N. (2013) Alveolar ridge preservation. A systematic review. *Clinical Oral Investigations* **17**: 341-363.

Hernlund, E., Svedbom, A., Ivergard, M., Compston, J., Cooper, C., Stenmark, J. et al. (2013) Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Archives of Osteoporosis* **8**:136, 6-8.

Jilka, R.L. (1998) Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update. *Bone* **23(2)**: 75-81.

Jilka, R.L. (2003) Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Medical and Paediatric Oncology* **41(3)**: 182-185.

Jung, R.E., Fenner, N., Hämmerle, C.H. & Zitzmann, N.U. (2013) Long-term outcome of implants placed with guided bone regeneration (GBR) using resorbable and non-

resorbable membranes after 12-14 years. *Clinical Oral Implants Research* **24**: 1065-1073.

Kassem, M., Marie, P.J. (2011) Senescence-associated intrinsic mechanisms of osteoblast dysfunctions. *Aging Cell* **10**(2): 191-197.

Kim, S.Y., Kim, S.G., Lim, S.C. & Bae, C.S. (2004) Effects on bone formation in ovariectomized rats after implantation of tooth ash and plaster of Paris mixture. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery* **62**: 852-857.

Kubo, T., Shiga, T., Hashimoto, J., Yoshioka, M., Honjo, H., Urabe, M. et al. (1999) Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **68**(5-6): 197-202.

Lelovas, P.P., Xanthos, T.T., Thoma, S.E., Lyritis, G.P. & Dontas, I.A. (2008) The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comparative Medicine* **58**: 424-430.

Li, G.W., Xu, Z., Chang, S.X., Zhou, L., Wang, X.Y., Nian, H. & Shi, X. (2014 a) Influence of early zoledronic acid administration on bone marrow fat in ovariectomized rats. *Endocrinology* **155**: 4731-4738.

Li, C.L., Lu, W.W., Seneviratne, C.J., Leung, W.K., Zwahlen, R.A. & Zheng, L.W. (2014b) Role of periodontal disease in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in ovariectomized rats. *Clinical Oral Implants Research* **00**:1-9

Luize, D.S., Bosco, A.F., Bonfante, S. & de Almeida, J.M. (2008) Influence of ovariectomy on healing of autogenous bone block grafts in the mandible: a histomorphometric study in an aged rat model. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants* **23**: 207-214.

Mardas, N., Kostopoulos, L. & Karring T. (2002) Bone and suture regeneration in calvarial defects by e-PTFE-membranes and demineralised bone matrix and the impact on calvarial growth: an experimental study in the rat. *Journal of Craniofacial Surgery* **13**:

453-462.

Mardas, N., Chadha, V. & Donos, N. (2010) Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovine-derived xenograft: A randomized, controlled clinical trial. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 688-698.

Mardas, N., Schwarz, F., Petrie, A., Hakimi, A-R., Donos, N. (2011) The effect of SLActive surface in guided bone formation in osteoporotic-like conditions. *Clinical Oral Implants Research* **22**(4): 406-415.

Mardas, N., Trullenque-Eriksson, A., MacBeth, N., Petrie, A. & Donos N. (2015) Does ridge preservation following tooth extraction improve implant treatment outcomes: a systematic review: Group 4: Therapeutic concepts & methods *Clinical Oral Implants Research* Jun 16. doi: 10.1111/clr.12639. [Epub ahead of print]

Marouf, H.A. & El-Guindi, H.M. (2000) Efficacy of high-density versus semipermeable PTFE membranes in an elderly experimental model. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontology* **89**:164–170.

Muruganandan, S., Roman, A. A., and Sinal, C. J. (2009) Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell Mol. Life Sci.* **66**: 236–253.

Nascimento, R.D., Cardoso, P.E., De Marco, A.C., de Lima, L.A. & Jardini, M.A. (2009) Influence of osteopenia in autogenous bone graft healing with or without expanded polytetrafluoroethylene membranes: histologic and histomorphometric study in rats. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **24**: 1074–1082.

Namkung-Matthai, H., Appleyard, R., Jansen, J., Hao Lin, J., Maastricht, S., Swain, M., Mason, R.S., Murrell, G.A., Diwan, A.D. & Diamond, T. (2001) Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone* **28**: 80-86.

Oberg, S., Johansson, C. & Rosenquist JB (2003). Bone formation after implantation of autolysed antigen extracted allogeneic bone in ovariectomized rabbits. *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery* **32**:628-632.

Oliver, R.A., Yu, Y., Yee, G., Low, A.K., Diwan, A.D., Walsh, W.R. (2013) Poor histological healing of a femoral fracture following 12 months of oestrogen deficiency in rats. *Osteoporosis International* **24**: 2581–2589.

Peter, B., Gauthier, O., Laïb, S., Bujoli, B., Guicheux, J., Janvier, P., Van Lenthe, G.H., Müller, R., Zambelli, P.Y. & Bouler, J.M. (2006) Local delivery of bisphosphonate from coated orthopedic implants increases implants mechanical stability in osteoporotic rats. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **76**: 133-143.

Retzepi, M. & Donos, N. (2010) Guided bone regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 567–576.

Rodriguez, J.P., Astudillo, P., Rios, S., Pino, A.M. (2008) Involvement of adipogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in osteoporosis. *Current Stem Cell Research & Therapy* **3**(3): 208-218.

Ruggiero, S.L, Dodson, T.B., Fantasia, J., Goodday, R., Aghaloo, T., Mehrotra, B. & O’Ryan, F. (2014) American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery* **72(10)**: 1938-1956.

Schenk, R., K., Buser, D., Hardwick, W., R. & Dahlin, C. (1994) Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants* **9(1)**: 13-29.

Schwarz, F., Sahm, N., Bieling, K. & Becker, J. (2009) Surgical regenerative treatment of peri-implantitis lesions using a nanocrystalline hydroxyapatite or a natural bone mineral in combination with a collagen membrane: a four-year clinical follow-up report. *Journal of Clinical Periodontology* **36**: 807-814.

Serrano, A.J., Begoña, L., Anitua, E., Cobos, R. & Orive, G. (2013) Systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of alendronate and zoledronate for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Gynecology & Endocrinology* **29**: 1005–1014.

Shen, V., Birchman, R., Xu, R., Lindsay, R. & Dempster, D.W. (1995) Short-term changes in histomorphometric and biochemical turnover markers and bone mineral density in oestrogen-and/or dietary calcium-deficient rats. *Bone* **16**: 149-156.

Silva, P.G., Ferreira Jr., A.E., Teófilo, C.R., Barbosa, M.C., Lima, Jr. R.C., Sousa, F.B., Mota, M.R., Ribeiro, R.A. & Alves, A.P. (2015) Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. *Archives in Oral Biology* **60**:1237-1245.

Simion, M., Baldoni, M., Rossi, P. & Zaffe, D. (1994) A comparative study of the effectiveness of e-PTFE membranes with and without early exposure during the healing period. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **14**: 167– 180.

Stadelmann, V.A., Terrier, A., Gauthier, O., Bouler, J.-M. & Pioletti, D.P. (2009) Prediction of bone density around orthopaedic implants delivering bisphosphonate. *Journal of Biomechanics* **42**: 1206-1211.

Stavropoulos, A., Sculean, A., Bosshardt, D, Buser, D. & Klinge, B. (2015) Pre-clinical *in vivo* models for the screening of bone biomaterials for oral/craniofacial indications: focus on small-animal models, *Periodontology 2000*, **68**: 55-65.

Thompson, D.D., Simmons, H.A., Pirie, C.M. & Ke, H.Z. (1995) FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* **17(4 Suppl)**: 125S-133S.

Toricelli, P., Fini, M., Giavaresi, G., Giardino, R. (2002) Human osteoblast cultures from osteoporotic and healthy bone: biochemical markers and cytokine expression in basal conditions and in response to 1,25(OH)₂D₃. *Artificial Cells Blood Substitutes Immobilility Biotechnology* **30**:219-227.

Tsolaki, I.N., Madianos, P.N. & Vrotsos, J.A. (2009) Outcomes of dental implants in osteoporotic patients. A literature review. *Journal of Prosthodontics* **18**:309-323.

Turner, AS. (2001) Animal models of osteoporosis—necessity and limitations. *European Cells & Materials* **1**: 66–81.

Urban, I.A., Nagursky, H., Lozada, J.L. & Nagy, K. (2013) Horizontal ridge augmentation with a collagen membrane and a combination of particulated autogenous bone and anorganic bovine bone-derived mineral: a prospective case series in 25 patients. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **33**:299-307.

U.S. Department of Health & Human Services. (2014) A profile of Older Americans: 2014 – Administration on Ageing. Administration for Community Living. http://www.aoa.acl.gov/Aging_Statistics/Profile/2014/docs/2014-Profile.pdf.

Vajgel, A., Mardas, N., Farias, B., C., Petrie, A., Cimões, R., & Donos, N. (2013) A systematic review on the critical size defect model. *Clinical Oral Implants Research*. **25**: 879-893.

Verma, S., Rajaratnam, J.H., Denton, J., Hoyland, J.A. & Byers RJ. (2002) Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis. *Journal of Clinical Pathology* **55**: 693-698.

Von Arx, T. & Buser, D. (2006) Horizontal ridge augmentation using autogenous block grafts and the guided bone regeneration technique with collagen membranes: a clinical study with 42 patients. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 359-366.

Vidigal, G.M, Jr, Groisman, M., Gregorio, L.H. & Soares, G.A. (2009) Osseointegration of titanium alloy and HA-coated implants in healthy and ovariectomized animals: a histomorphometric study. *Clinical Oral Implants Research* **20**: 1272-277.

Zellin, G., Hakanson, R., Linde, A. (2002) Gastrectomy has no effect on bone regeneration in rats despite a decrease in bone mass. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2002: **37**: 1149–1.

Zhu, M., Liang, L., Pan, L., Huang, B., Qian, W., Zhong, J.H., Zheng, W.W. & Li, C.L. (2013) Zoledronate for metastatic bone disease and pain: a meta-analysis of randomized clinical trials". *Pain Medicine* **14** (2): 257–64155.

3.8 TABLES

3.8.1. Table 1 – Semi-quantitative analysis for new bone formation and defect closure

Group	No specimens	-/-	+/-	++/-	++/+	+++/+
<i>O 30d empty</i>	6	2	3	1		
<i>O 30d GBR</i>	6			2	2	2
<i>O 60d empty</i>	6	4	2			
<i>O 60d GBR</i>	6			3	2	1
<i>OZ 30d empty</i>	6		6			
<i>OZ 30d GBR</i>	6			2	2	2
<i>OZ 60d empty</i>	7		4	3		
<i>OZ 60d GBR</i>	7				2	5
<i>C 30d empty</i>	6	2	3	1		
<i>C 30d GBR</i>	6				4	2
<i>C 60d empty</i>	7	1	6			
<i>C 60d GBR</i>	7		1	1	1	4

-/- : No new bone formation, no defect closure

+/- : Minimal new bone formation, no defect closure

++/- : Significant new bone formation, no defect closure

++/+ : Significant new bone formation, defect closure

+++/+ : New bone formation outside the original envelop, defect closure

3.8.2. Table 2 – Mean (+/- standard deviation), median and range of newly formed bone (NFB) expressed as percentage of total area defect closure.

Group	MEMBRANE	NFB
O30d	No(n=6)	
	Mean	18.83 (\pm 24.13)
	Range	(0.00-64.05)
	Median	11.85
	Yes (n=6)	
	Mean	78.99 (\pm 21.00)
	Range	(42.82-100.00)
	Median	77.76
	O60d	No (n=6)
Mean		10.81 (\pm 17.45)
Range		(0.00-40.19)
Median		0.0000
Yes (n=6)		
Mean		78.29 (\pm 14.40)
Range		(62.72-100.00)
Median		76.86
Overall		Mean
	Median	52.77
OZ30d	No(n=6)	
	Mean	27.17 (\pm 7.88)
	Range	(18.08-37.11)
	Median	25.05
	Yes (n=6)	
	Mean	93.08 (\pm 9.61)
	Range	(78.37-100.00)
	Median	98.25
	OZ60d	No(n=7)
Mean		51.61 (\pm 39.47)
Range		(8.00-99.14)
Median		48.76
Yes (n=7)		
Mean		95.83 (\pm 9.02)
Range		(75.81-100.00)
Median		100.00
Overall		Mean
	Median	83.07

C30d	No(n=6)	
	Mean	30.97 (± 36.82)
	Range	(00.00-94.06)
	Median	19.10
	Yes (n=6)	
	Mean	84.21 (± 26.87)
	Range	(31.05-100.00)
	Median	19.10
C60d	No(n=7)	
	Mean	15.69 (± 12.08)
	Range	(0.00-39.10)
	Median	13.48
	Yes (n=7)	
	Mean	90.11 (± 26.16)
	Range	(30.78-100.00)
	Median	100.00
Overall	Mean	55.06
	Median	46.34

3.8.3. Table 3 – Hierarchical analysis of variance for NFB expressed as percentage of defect closure

Source	Numerator df	Denominator df	F	P-value
Condition (OVX, OVX+ZA, SHAM)	2	66	7.82	0.001
Membrane (yes,no)	1	66	89.75	0.000
Time (30 days, 60 days)	1	66	.19	0.662
Condition * membrane	2	66	.86	0.427
Condition * time	2	66	1.67	0.195
Membrane * time	1	66	.55	0.462

3.8.4. Table 4 – Multiple comparisons between the condition groups for logit NFB with Bonferroni's correction for multiple testing

(J)Condition		95 % Confidence interval				
		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	P-value
OVX	OVX+ZA	-4.074	1.051	-6.656	-1.493	.001
	SHAM	-2.813	1.051	-5.394	-.231	.028
OVX+ZA	SHAM	1.26	1.031	-1.272	3.795	.677

LEGENDS

Table 1: Semi-quantitative analysis for new bone formation and defect closure

Table 2: Mean (+/- standard deviation), median and range of newly formed bone (NFB) expressed as percentage of total area defect closure

Table 3: Hierarchical analysis of variance for NFB expressed as percentage of defect closure

Table 4: Multiple comparisons between the condition groups for logit NFB with Bonferroni's correction for multiple testing

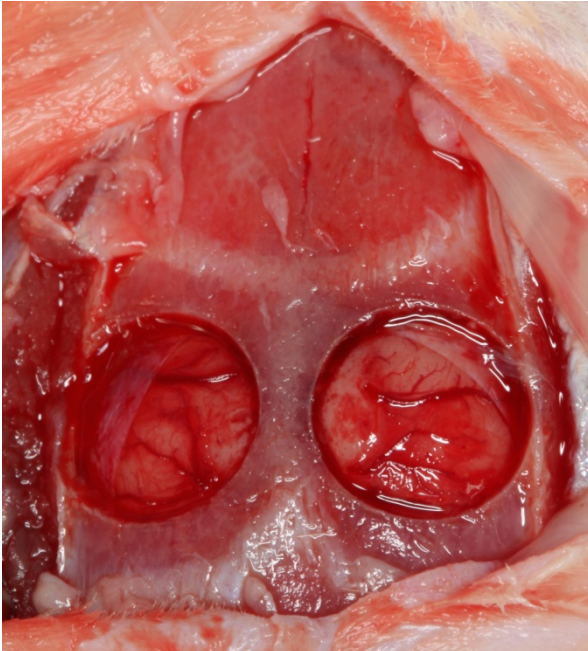


Figure 1: One critical size, full-thickness, 5mm, trephine defect was made in the center of each parietal bone.

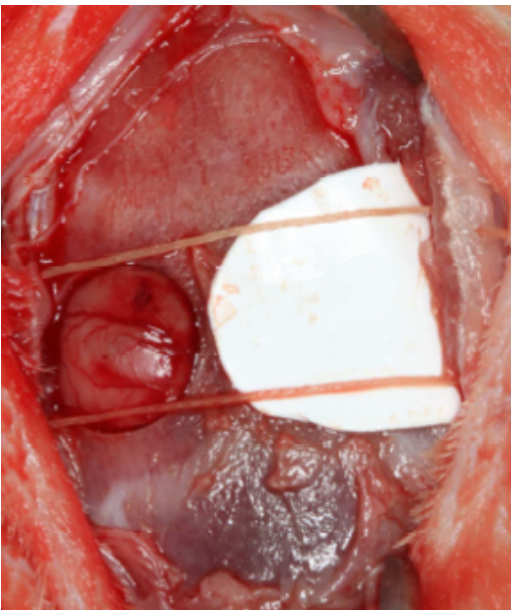


Figure 2: The right defect was treated with a double layer non-resorbable; dense PTFE membrane (Cytoplast®, Regentex GBR-200, Osteogenics Biomedicals, Lubbock, EUA). The first layer of the membrane was placed under the parietal bone, in contact with the underlying dura mater and the second layer of the membrane was placed at the outer surface of the defect extending at least 3 mm beyond the borders of the defect. The left defect remained empty.

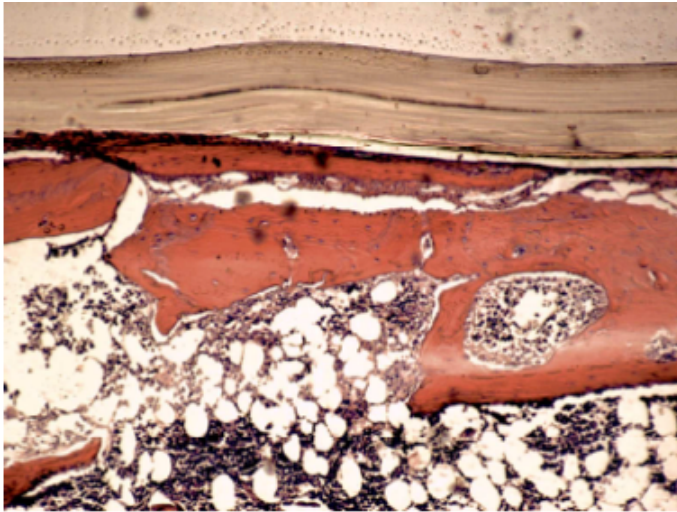


Figure 3a: The calvarial bone is characterized by thin trabeculae with reduced connectivity and large marrow spaces with a high number of fat cells. (Haematoxylin and eosin, original magnification x 100)

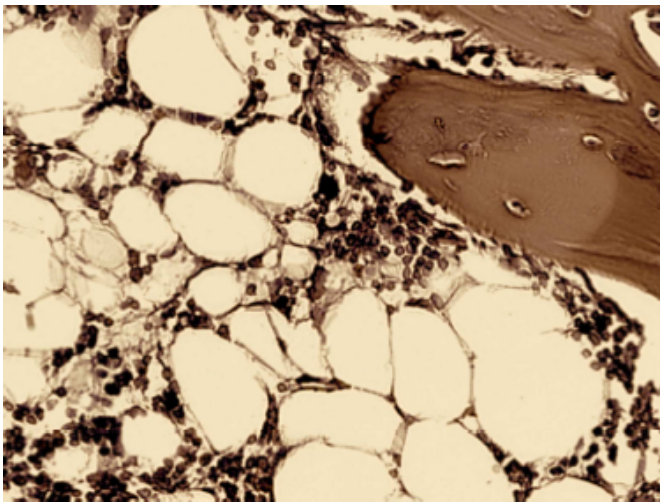


Figure 3b: osteoclastic resorption of the osseous trabeculae and adipocytes in the marrow spaces. (Magnification x 200)

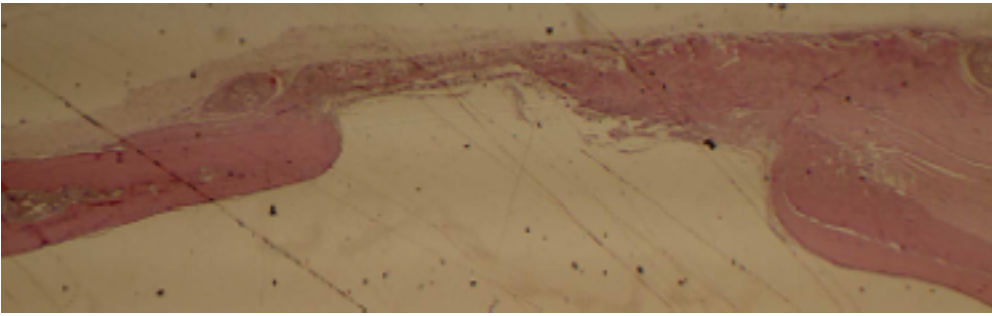


Figure 4a

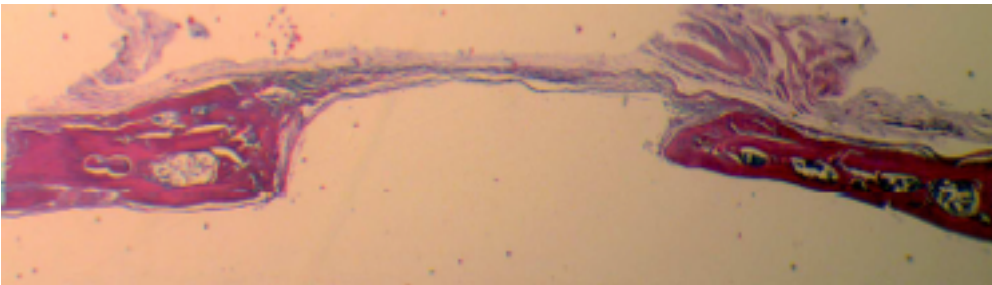


Figure 4b

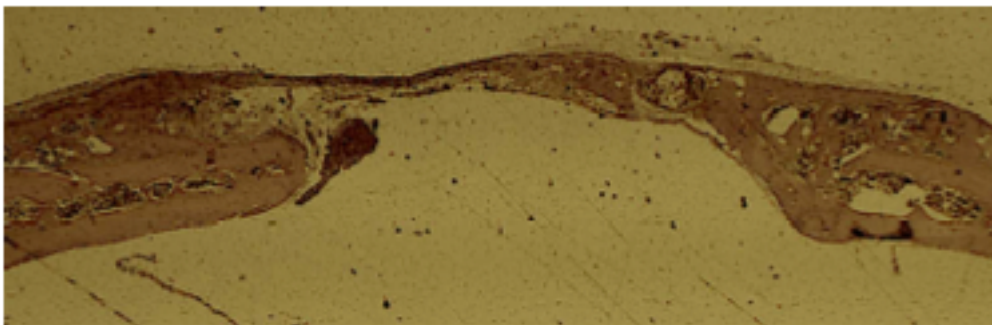


Figure 4c

Figure 4: Photomicrographs of the untreated defect area and the newly formed bone (NFB) in all three groups (**4a**: C30d, **4b**: O30d, **4c**: OZ30d) after 30 days of healing. A thin layer of connective tissue occupied the major part of the defect. Limited amounts of bone formation had occurred occasionally at the bony margin of the defect (Haematoxylin and eosin, original magnification x 2).

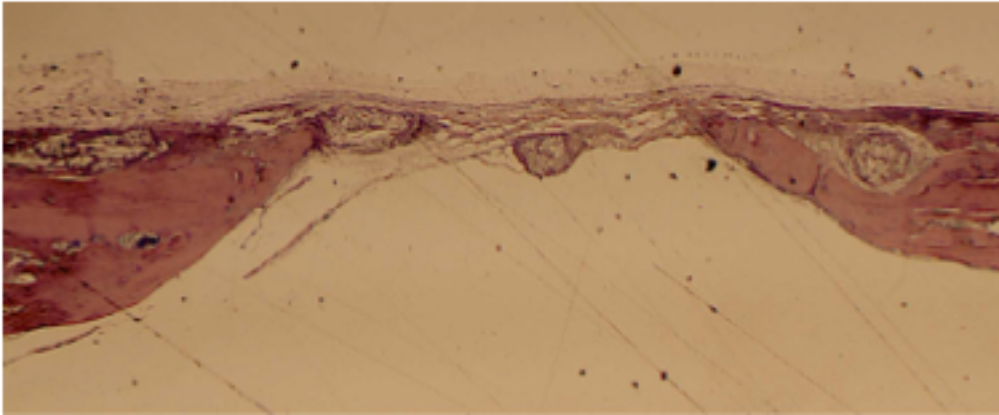


Figure 5a

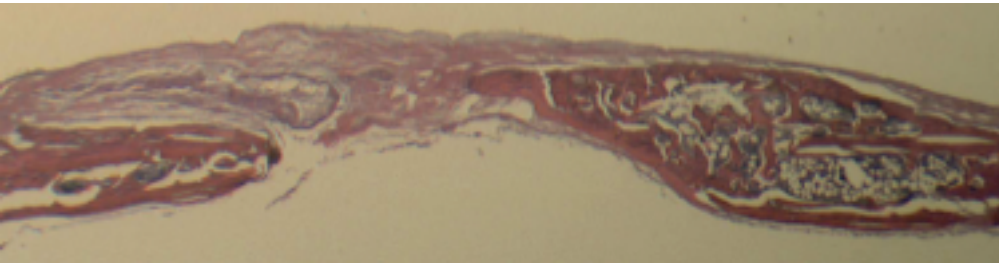


Figure 5b

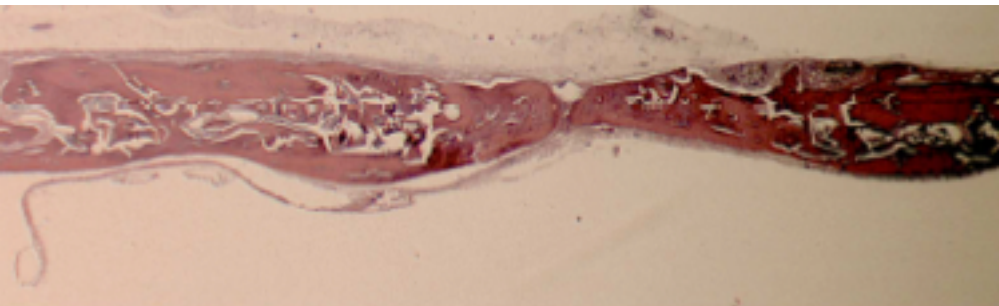


Figure 5c

Figure 5: Photomicrographs of the untreated defect area and the newly formed bone (NFB) in all three groups (**5a**: C60d, **5b**: O60d, **5c**: OZ60d) after 60 days of healing. A dense layer of connective tissue occupied the major part of the defect. Limited amounts of bone formation had occurred occasionally at the bony margin of the defects in C (**5a**) and O (**5b**) group. Increased new bone formation in comparison to the 30days-healing period and almost complete closure was observed in some specimens from the OZ group (**5c**) (Haematoxylin and eosin, original magnification x 2).

Figure 6: Photomicrographs of GBR treated defect area in all three groups after 30 days

of healing (Haematoxylin and eosin, original magnification x 2).

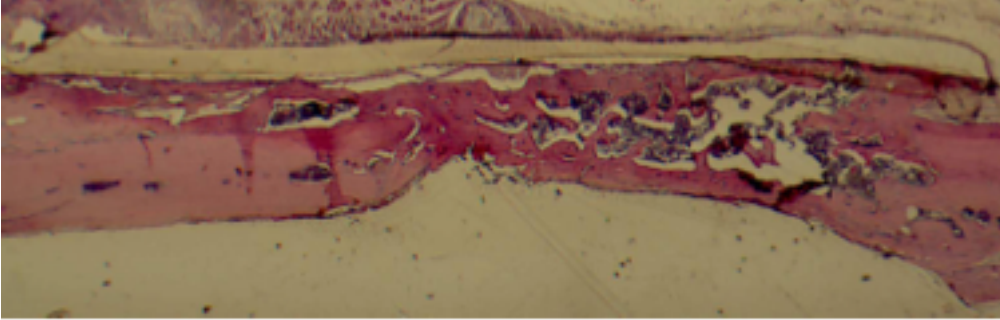


Figure 6a: Photomicrograph of the GBR treated defect area in a sham-operated animal after 30 days of healing (C30dGBR). Complete defect closure was achieved as a result of new bone formation. The newly formed bone was characterized by thick trabeculae and small marrow spaces.

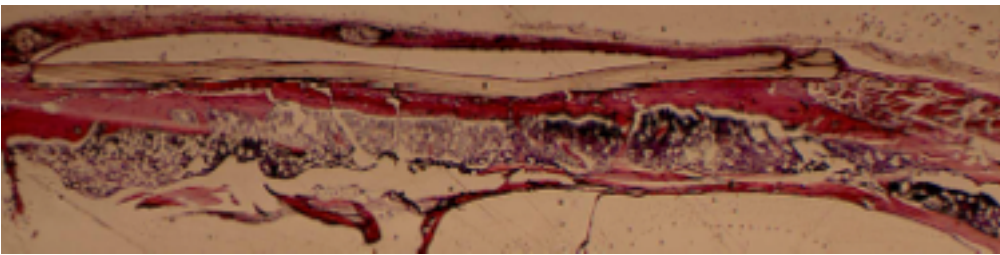


Figure 6b: Photomicrograph of the GBR treated defect area in an OVX animal after 30 days of healing (O30dGBR). Complete defect closure was achieved as a result of new bone formation. The newly formed bone was characterized by extensive marrow spaces, rich in adipocytes and thinner cortical plates.

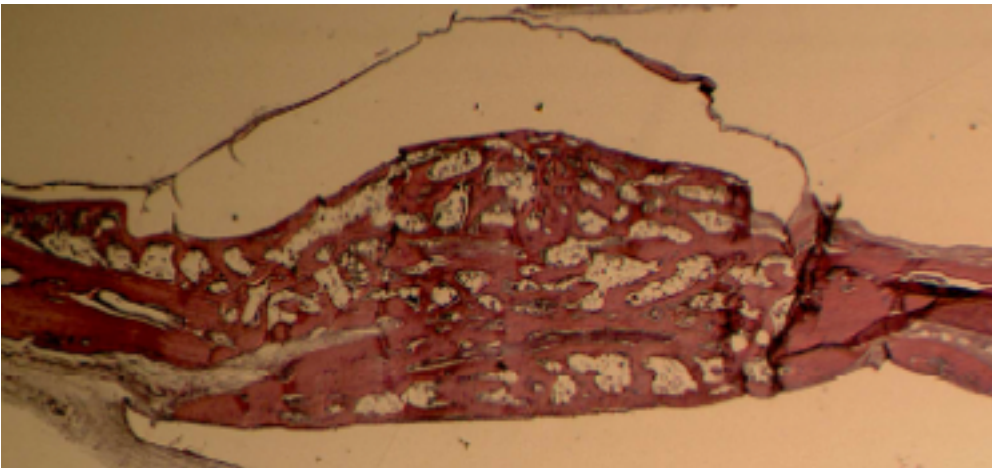


Figure 6c: Photomicrograph of the GBR treated defect area in an OVX treated with ZA animal after 30 days of healing (OZ30dGBR). Complete defect closure was achieved as

a result of new bone formation. The NFB presented with thicker trabeculae and less extended marrow spaces in comparison to O30d animals. The newly formed bone was extending beyond the original contour of the calvarium.

Figure 7: Photomicrographs of GBR treated defect area in all three groups after 60 days of healing (Haematoxylin and eosin, original magnification x 2).

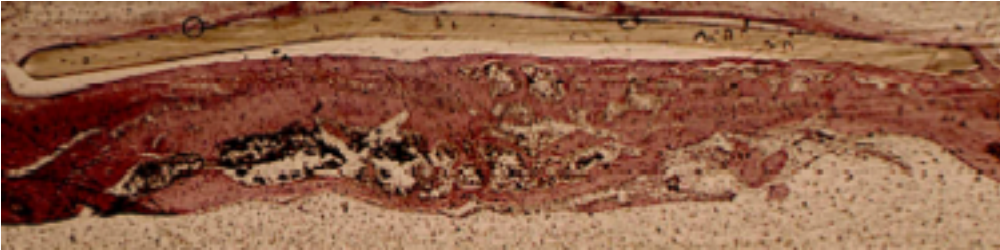


Figure 7a: Photomicrograph of the GBR treated defect area in a sham-operated animal after 60 days of healing (C60dGBR). Complete defect closure was achieved as a result of new bone formation. The newly formed was characterised by thick trabeculae and small marrow spaces.

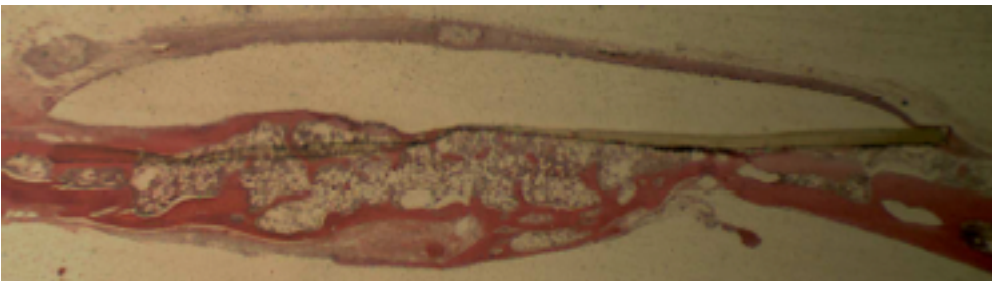


Figure 7b: Photomicrograph of the GBR treated defect area in an OVX animal after 30 days of healing (O60dGBR). Complete defect closure was achieved as a result of new bone formation. The newly formed bone was characterized by extensive marrow spaces, rich in adipocytes and thin trabeculae and cortical plates.

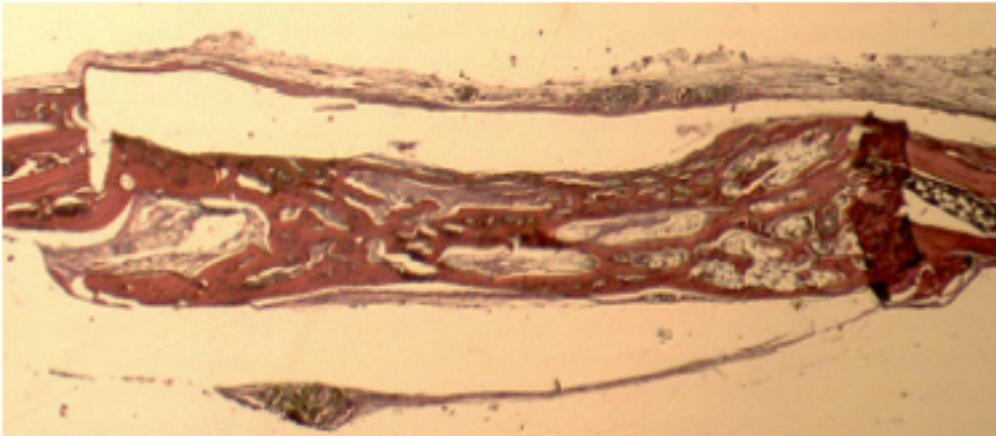


Figure 7c: Photomicrograph of the GBR treated defect area in an OVX treated with ZA animal after 60 days of healing (OZ60dGBR). Complete defect closure was achieved as a result of new bone formation. The NFB presented with thicker trabeculae and less extended marrow spaces in comparison to O60d animals.

4. ARTIGO 2

REVIEW ARTICLE: THE RELATION BETWEEN ENDODONTIC TREATMENT AND THE SISTEMIC USE OF BISPHOSPHONATES

JOE – American Association of Endodontics

Juliano Buseti, DDS*, Jose Antonio Poli de Figueiredo, DDS, MSc, PhD**, Roberta Kochenborger Scarparo, DDS, MSc, PhD***, Nikos Mardas, DDS, MSc, PhD****

Abstract

Introduction

Bisphosphonates (BP) are commonly prescribed for osteoporosis, Paget disease, multiple myeloma and bone cancer metastasis. Their main effect is to reduce osteoclastic bone resorption. The use of BP however, has been associated to clinical complications in the dental field, including osteonecrosis of the jaw (ONJ). The aim of the present review is to investigate the possible influence of the systemic use of bisphosphonates on endodontic treatment.

Methods

A search was performed in Medline (restricted to English language) using the following search terms or combinations: “bisphosphonates AND endodontic treatment”, osteonecrosis and endodontic protocols, endodontic surgery and/or bisphosphonates, endodontic surgery and/or osteonecrosis, bisphosphonate properties and/or endodontic treatment, endodontic surgery, bisphosphonates side effects and/or endodontic treatment to identify relevant publications.

Conclusion

Endodontic treatment may play a role on preventing further ONJ in patients taking BP. BP however, might affect the healing of endodontic treatment and clinicians may face different results when treating those patients.

Key Words: bisphosphonates, endodontic treatment, osteonecrosis

Acknowledgments

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

* PhD Student, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Dental School

** Head of Clinical Department, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Dental School

***Senior Lecturer, Department of Endodontics, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Dental School

**** Senior Clinical Lecturer, Honorary Consultant, Oral Adult Health, Bart's & The London School of Dentistry, Queen Mary University, London, UK.

Introduction

Bisphosphonates (BP) are the most widely prescribed drugs for the treatment of osteoporosis and skeletal metastases. These drugs are employed in specific bone metabolic diseases and disorders, such as osteoporosis, Paget disease and multiple myeloma (1-2), being, more recently, also indicated for the prevention and adjunct therapy of lung, colon and breast cancer methasthesis (3).

BP act as analogues of pyrophosphate and their main effect is to inhibit osteoclastic activity by reducing osteoclast differentiation and maturation inducing cellular loss of function and death, so called apoptosis. BP accumulate in bone matrix as it binds to hydroxyapatite and their concentration is higher at sites with more pronounced bone metabolism. After binding to a mineralized bone surface, they are taken up by osteoclasts during bone resorption. Once BP are ingested, osteoclastic activity will be

impaired by the medication's action on the mevalonate branch pathway, which is a chain of lipids (isoprenoid diphosphonate) and enzymes (guanosine triphosphate) responsible for normal cellular function. This will result in their apoptosis since the osteoclasts being unable to resorb bone, lose their ruffled borders (4). Osseous half-life of bisphosphonates has been reported as long as 10 years and so its action might influence healing for a long period of time, even after patients quit using the medication (9), which has a cumulative dosage effect (6).

There are 2 general types of BP: non-nitrogen and nitrogen containing; and 2 routes of administration: oral and intravenous (IV). The nitrogen has a greater extent mode of action causing vast osteoclastic death (4). Zoledronic acid is an example of nitrogen BP, used more commonly for cancerous metastasis. Alendronate is another example for nitrogen BP, indicated for prevention or treatment of osteoporosis (5). As non-nitrogen containing, Etidronate is known as a less potent BP prescribed in the early 80's for hypertrophic calcifications (4) (table 1).

With the growth of the population under BP intake, the long-term use of the medication has been associated to complications, especially in relation to different dental and oral surgical procedures (2,4,5,6). The mandible has a higher bone turnover activity and is highly vascularized, leading to an increased local concentration of BP. Osteonecrosis of the jaw (ONJ) is one of the most important complications associated with BP. The first time it was officially published by the literature was in 2003 (7). It is considered ONJ the presence of exposed bone in the oral cavity, which persists for more than 8 weeks in a patient who was receiving or had been exposed to BP with no previous history of radiation therapy to the craniofacial region (3,5,7-8).

Dental extractions and other invasive surgical procedures are considered risk factors for ONJ (2). Root canal treatment might be influenced by BP administration as bone healing may be affected but also endodontic treatment can play an important role for those patients at risk of ONJ since it can avoid more invasive procedures (2,4-5). The aim of

the present review was to investigate the possible influence of the systemic use of bisphosphonates on endodontic treatment.

Methods

Although this is a narrative, critical review, the authors conducted a comprehensive systematic search in MEDLINE (1997 to 2015) to identify as many as possible relevant papers and minimize bias in the selection of the included papers. The following search terms and combinations were used: “bisphosphonates AND endodontic treatment”, osteonecrosis AND endodontic protocols, endodontic surgery AND/OR bisphosphonates, endodontic surgery AND/OR osteonecrosis, bisphosphonate properties AND/OR endodontic treatment, endodontic surgery, bisphosphonates side effects AND/OR endodontic treatment. A three-stage screening, where titles and abstracts were analyzed separately and if they met the inclusion criteria, full text analyses were performed to increase screening precision. Only clinical trials and case series written in English were included.

Endodontic therapy on patients using bisphosphonates

Radiographic healing of periapical lesions have been tested comparing patients with long-term use of oral bisphosphonates to control. Hsiao et al. (10) did not find any statistical difference between groups with or without regular use of bisphosphonates at follow up. The authors performed a retrospective clinical and radiographic study with a total of 28 subjects (34 teeth) on the test group and 30 control patients (38 teeth) at follow up after endodontic treatment or retreatment. The median recall time was 14 months for the test group and 13 for the control.

Xiong et al. (11) have found a positive relation on periapical lesion reduction of estrogen-deficient rats that received alendronate when compared to control animals. The author induced periapical lesions and compared control group to ovariectomized (OVX) animals, divided in 2 test groups: OVX and OVX under alendronate (ALD) medication. The results revealed that OVX animals had a higher amount of periapical

bone loss compared to control and OVX + ALD groups, indicating a positive effect of ALD on reducing bone loss when periapical lesions were induced. The author also evaluated the enzymehistochemical function of osteoclastic activity and found that the periapical presence of such cells was reduced under the use of ALD when compared to OVX group that did not receive medication.

External cervical resorption pathogenesis and etiology are not well understood. Patel et al. (12) have described 3 case series of external cervical resorption that the author attributes to bisphosphonate intake as a predisposing factor. The patients diagnosed with resorption had no history of the several classic potential predisposing factors for resorption such as trauma, orthodontic and/or periodontal treatment, bleaching and genetic predisposition. All of them had been on oral bisphosphonates treating osteoporosis for at least 5 years.

Guidelines of endodontic treatment for patients under BP therapy

Patients should always perform dental examination and treatment, when needed, prior to starting BP medication. Prevention seems to be a way to reduce further risks of complications (4,13). The American Dental Association has suggested that patients at risk of ONJ should be referred for noninvasive dental treatment (14). Endodontic treatment is less invasive and is preferred when compared to extraction of decayed teeth. Endodontic treatment can be responsible for reducing the presence of infection, and so it might have an impact on preventing future ONJ as such disease seems to have a direct relation with dental infection (2,14-15). Around 60% of ONJ occurs after surgical procedures (16). Increased risks, from 5 to 21 fold, were found for ONJ considering patients under the use of BP who were exposed to surgical procedures (16). Endodontic treatment has not been associated to be a risk factor for ONJ (2, 4).

As the use of BP and its risk for ONJ is related to the cumulative dosage effect of the drug, it has been suggested that individuals on oral BP for less than 3 years are not at risk (2,4,6). Marx (4) suggests that whenever a patient is taking an oral BP for more than 3 years and needs a dental procedure, the medication should be suspended 3 months previously. The author also suggests to perform C-terminal cross-linking

telo peptide of type I collagen (CTX) serum test before oral procedures (4).

CTX is a bone turnover marker and can be assessed by blood serum laboratory tests (3, 7). According to Marx (4) values over 150 pg/mL are associated to a minimal risk for developing ONJ. The utility of such exam is to correlate that individuals using BP with a low level of bone turn over could be at risk of ONJ as it measures the degree of bone turnover suppression. According to the author if CTX values are under 100 pg/mL there is a high risk for ONJ (4).

Single-dose amoxicillin antibiotic prophylaxis may benefit patients with infected endodontic disease that are using oral BP for 3 or more years as well as for individuals treated with IV BP. If the patient is allergic to amoxicillin, clindamycin is another choice (5).

Rubber dam clamp has been related to ONJ. It has been suggested that endodontic procedures should be performed with extreme care regarding tissue manipulation when performing endodontic treatments (18).

Recommendations involving endodontic treatment (history of IV BP or more than 3 years of oral BP)

- Endodontic treatment is preferable to surgical procedures (14-15).
- In case of patients with history of IV BF surgical procedures are not indicated (14-15).
- Instrumentation beyond the apex should be avoided (15).
- If needed, surgical procedures should be as conservative as possible and the patient needs to consent for possible risk of ONJ (4,14-15).
- Use of antibiotic prophylaxis for patients at risk (5).

Discussion

The frequency of ONJ is quite variable. Some studies relate 7% for IV BP and only 0,12 for oral BP (6), while others mention an unlike relation between ONJ and oral BP and from 1,2 to 6,8% incidence in cases where IV BP was used (19). Khan at al. (8) published an international consensus on ONJ relating prevalence from 0 to 0,04% of

osteoporotic patients exposed to BP who develop ONJ and from 0 to 0,186% for those who were on IV BP for cancer treatment. The data include limited prospective and retrospective studies.

It seems that only patients who were under treatment with high doses as well as for a longer period of time had risk for developing ONJ (20-21). It has also been reported that only 5% of ONJ cases are associated to subjects who had been treated for osteoporosis, while the majority of the cases are myeloma and cancer patients who developed ONJ after IV BP prescription. Depending on the treatment one has to bear in mind that adjunctive drugs are prescribed such as glucocorticoids. Reid et al. (19) reported that it was not possible to explain why ONJ was more frequent in some cancer types.

Marx (4) suggests the suspension of oral BP 3 months prior to dental procedures but the ADA Dental Management of Patients Receiving Oral Bisphosphonate Therapy-Expert Panel Recommendations (15) describes that discontinuation of the medication may not reduce or eliminate the risks. As most of the dental protocols for preventing ONJ are based on experts opinion, suspension of the medication it is not a consensus as a protocol.

Adding CTX test as another preventive measure is quite controversial as well. Marx attributes the data from CTX as a mean for assessing ONJ risk. The serum exam determines the level of bone metabolism (4, 22). The author tested such hypothesis by performing CTX serum exam up to 6 months after suspending oral BP on female patients who were diagnosed with ONJ. The CTX results presented a longitudinal increase at follow up, from mean 73 pg/mL at baseline to 228 pg/mL after 6 months without BP intake (22). Kwon et al. (23) has published a retrospective study comparing CTX from ONJ patients to CTX from control patients, who did not develop ONJ, but were also medicated with oral BP. The results showed a lower CTX level on ONJ patients (93.2 mg/pL) when compared to control (125 pg/dL) but the mean between the groups was not significant ($p= 0.12$). It is unknown how efficient CTX data is in terms of predictability (8). CTX serum test might be a useful tool for prevention but well-controlled randomized clinical trials should be performed (24) to test such hypothesis.

After developing ONJ withdrawing treatment with BP seems not to influence on its healing pattern (25). Abu-Id et al (26) published a case series observation reporting ONJ in patients with a history of IV BP intake from 6 up to 60 months.

As surgical procedures are more related to start ONJ, noninvasive endodontic treatment is recommended as a way to avoid extractions (14-16, 27). There are no scientific evidences of the risks that nonsurgical endodontic treatment may have on ONJ. Moinzadeh et al. (28) also refers the possible need for antibiotics prophylaxis for patients who are referred for endodontic treatment of necrotic teeth since extrusion of debris beyond the apex is considered a normal event. Since there might be a microbial factor associated to ONJ, antibiotics might help to prevent lesions when treating patients who are or have been medicated with BP (29). Marx et al (22) have also reported possible multiple co-morbidity factors associated with ONJ such as periodontal disease, decay and dental abscesses. It seems that general oral health should be targeted especially when dealing with BP patients, not only avoiding surgical procedures but also solving the above described conditions. Considering that it has been shown a possible relation of bacterial infection as biofilms in ONJ sites (29), maintenance of low level of oral bacteria might influence the progression of ONJ. According to the National Health Service (NHS) Clinical Guidance for patients prescribed BP (30), it has been recommended that, if possible, surgical procedures should be avoided when dealing with patients that are fit into an increased risk for developing ONJ. The NHS classifies as high-risk, individuals who have a history of IV BP, BP associated with immunosuppressant or previous history of ONJ (30). Avoiding a more invasive procedure is a consensus among research articles, but evidence based management is still lacking.

Gallego et al. (18) have published a case report of a patient who was referred for endodontic treatment in order to benefit from an atraumatic procedure, avoiding tooth extraction. The patient had been treated with Zoledronic Acid for multiple myeloma and had a history of ONJ, which had been treated and solved. According to the authors, after endodontic treatment, soft tissue lesions caused by the manipulation of the rubber dam clamp might have triggered another area of ONJ. There are not many evidence-based

data on ONJ causes. Therefore one should assume that extreme care should be taken on soft tissue manipulation, even considering the possibility of avoiding the use of rubber dam clamp when possible.

Hsiao et al. (10) did not find any statistical difference between the groups at radiographic healing follow-up of periapical lesions comparing patients with long term use of oral bisphosphonates to control. Xiong et al. (11) have found a positive relation on periapical lesion reduction of estrogen-deficient rats that received alendronate when compared to control animals. Patel et al. (12) have described a 3 case series of external cervical resorption and all of the patients had been on oral bisphosphonates treating osteoporosis for at least 5 year. Even being a low level of evidence, as most of the subjects correlating BP and endodontic conditions, observation should be taken on further similar situations.

Conclusions

Risks and benefits of the use of BP have to be taken into account when referring a patient for treatment with such medication. The low incidence of ONJ reported when dealing with oral BP does not justify the lack of care when dealing with dental clinical situations.

In conclusion the use of BP has been associated to clinical complications in the dental field as a side effect of its long-term intake. Endodontic treatment may play an important role on dealing with such patients by probably preventing further complications such as ONJ. Also, BP might affect the healing of endodontic treatment and clinicians may face different results when treating those patients.

References

1. Mhaskar R, Redzepovic J, Wheatley K, Clark OAC, Miladinovic B, Glasmacher A, et al. Bisphosphonates in multiple myeloma: a network meta-analysis. *Cochrane Database Systematic Review* 5. 2012 CD003188.
2. Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition,

- prevention, and treatment. *J Oral and Maxillofac Surg* 2005; 63:1567–75.
3. Marx RE. Oral & Intravenous Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaws: Histology, Etiology, Prevention and Treatment. Illinois: Quintessence books; 2007:1-95.
 4. Moinzadeh AT, Shemesh H, Neiryneck NAM, Aubert C, Wesselink PR. Bisphosphonates and their clinical implications in endodontic therapy. *International Endodontic Journal*, 2013;46, 391–8.
 5. Kuhl S, Walter C, Acham S, Pfeffer R, Lambrecht JT. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws - A review. *Oral Oncology*, 2012;48:938–47.
 6. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *Journal of Oral Maxillofac Surg*. 2003;61:1115-7.
 7. Khan AA, Morrison A, Hanley DA, Felsenberg D, McCauley LK, O’Ryan F, et al. Diagnosis and Management of Osteonecrosis of the Jaw: A Systematic Review and International Consensus. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2015 Jan 30 (1):3–23.
 8. Russell RG. Determinants of structure-function relationships among bisphosphonates. *Bone* 2007, 40:S21–5.
 9. Hsiao A, Glickman G, He J. A Retrospective Clinical and Radiographic Study on Healing of Periradicular Lesions in Patients Taking Oral Bisphosphonates, *JOE* 2009; 11:1525-1528.
 10. Xiong H, Peng B, Wei L, et al. Effect of an Estrogen-deficient State and Alendronate Therapy on Bone Loss Resulting from Experimental Periapical lesions in Rats. *J Endod* 2007;33:1304–8.
 11. Patel S, Saberi N. External Cervical Resorption Associated with the Use of Bisphosphonates: A Case Series. *JOE* May 2015; 41(5):742-8.
 12. Ripamonti CI, Maniezzo M, Campa T, Fagnoni E, Brunelli C, Saibene G, et al. Decreased occurrence of osteonecrosis of the jaw after implementation of dental preventive measures in solid tumor patients with bone metastases treated with bisphosphonates. The experience of the National Cancer Institute of Milan. *Ann Oncol* 2008.

13. Ruggiero SL, Fantasia J, Carlson E. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:433–41.
14. Beatrice E, Hellstein JW, Peter JL, Kaltman S, Mariotti A, Migliorati C. Updated recommendations for managing the care of patients receiving oral bisphosphonate therapy: An advisory statement from the American Dental Association Council on Scientific Affairs for the American Dental Association Council on Scientific Affairs Expert Panel on Bisphosphonate- Associated Osteonecrosis of the Jaw. *JADA* 2008;139(12):1674-7.
15. Bagan JV, Jimenez Y, Diaz JM, Murillo J, Sanchis JM, Poveda R, et al. Jaw osteonecrosis associated with bisphosphonates: multiple exposed areas and its relationship to teeth extractions. Study of 20 cases. *Oral Oncol.* 2006;42:327-9.
16. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B for the Task Force on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws: American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper: Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws—2009 update: The need to refine the BRONJ definition. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67:2698-2709.
17. Gallego L, Junquera L, Pelaz A, Díaz-Bobes C. Rubber Dam Clamp Trauma During Endodontic Treatment: A Risk Factor of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw? *J Oral Maxillofac Surg* 2011;69:e93-e95.
18. Reid IR. Osteonecrosis of the jaw: who gets it, and why? *Bone.* 2009;44:4-10.
19. Hoff AO, Toth BB, Altundag K, Johnson MM, Warneke CL, Hu M et al. Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. *Journal of Bone and Mineral Research* 2008;23 (6):826–36.
20. Durie BGM, Katz M, Crowley J. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates. *N Engl J Med* 2005;353:99–10.
21. 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;65:2397- 410.
22. Kwon YD, Ohe JY, Kim DY, Chung DJ, Park YD. Retrospective study of two

- biochemical markers for the risk assessment of oral bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: can they be utilized as risk markers? *Clin Oral Implants Res.* 2011;22:100–5.
23. Gupta S, Gupta H, Mandhyan D, Srivastava S. Bisphosphonates related osteonecrosis of the jaw. *Natl J Maxillofac Surg.* 2013 Jul-Dec; 4(2): 151–158.
24. Estilo CL, Van Poznak CH, Williams T, Bohle GC, Lwin PT, Zhou Q, et al. Osteonecrosis of the maxilla and mandible in patients with advanced cancer treated with bisphosphonate therapy. *The Oncologist* 2008 13, 911–20.
25. Abu-Id MH, Warnke PH, Gottschalk J, Springer I, Wiltfang J, Acil Y, et al. “Bisphossy jaws” — high and low risk factors for bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *J Cranio-Maxillofac Surg* 2008;36:95–103.
26. Edwards BJ, Gounder M, McKoy JM, Boyd I, Farrugia M, Migliorati C, et al. () Pharmaco- vigilance and reporting oversight in US FDA fast-track process: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. *Lancet Oncology* 2008;9(12):1166–72.
27. Moizadeh AT, Shemesh H, Neiryneck NAM, Aubert C, Wesselink PR. Bisphosphonates and their clinical implications in endodontic therapy. *International Endodontic Journal* 2013;46:391–398.
28. Ferraz CC, Gomes NV, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Apical extrusion of debris and irrigants using two hand and three engine-driven instrumentation techniques. *International Endodontic Journal* 2001;34:354–8.
29. Dental Management of Patients Prescribed Bisphosphonates – NHS Clinical Guidance, January 2015. (fonte da internet : link <http://www.england.nhs.uk/mids-east/wp-content/uploads/sites/7/2015/03/bisphosphonates-guidelines-2015.pdf>)

Tables

Table 1 – Types of bisphosphonates, indication, nitrogen containing, route and potency

Bisphosphonate (name)	Primary Indication	Nitrogen	Route of administration	Relative Potency
Etidronate (Didronel)	Paget disease	No	Oral	1
Tiludronate (Skelid)	Paget disease	No	Oral	50
Alendronate (Fosamax)	Osteoporosis	Yes	Oral	1000
Residronate (Actonel)	Osteoporosis	Yes	Oral	1000
Ibandronate (Boniva)	Osteoporosis	Yes	Oral	1000
Pamidronate (Aredia)	Bone metastasis	Yes	Intravenous	1000 – 5000
Zoledronate (Zometa)	Bone metastasis	Yes	Intravenous	10000+

5. DISCUSSÃO

Devido ao aumento na expectativa de vida da população mundial, dentistas envolvidos em reabilitações orais associadas à necessidade de procedimentos regenerativos, tratarão, cada vez mais, pacientes que apresentam osteoporose e usam medicamentos para tal, especialmente bisfosfonatos (BF). Dados científicos associam a osteoporose com alterações na formação óssea e osseointegração de implantes (FINI *et al.*, 2004; ERDOĞAN *et al.*, 2007), assim como na cicatrização de procedimentos regenerativos (LUIZE *et al.*, 2008). Porém outros estudos não demonstraram influência da osteoporose na cicatrização óssea (ZELLIN *et al.*, 2003). Somado a isto, apenas informações limitadas existem na literatura sobre a capacidade de reconstruções buco-maxilo-faciais de defeitos ósseos, em indivíduos diagnosticados com osteoporose, assim como sobre a influência do uso de medicações para tal patologia, nos procedimentos regenerativos (TSOLAKI *et al.*, 2009; DONOS *et al.*, 2015).

O presente estudo utilizou modelo de osteoporose induzida em ratas, com 6 meses de idade e defeitos críticos (CSD) de 5 mm, em osso parietal, bilateralmente, sendo um lado teste (ROG) e outro controle. Foi avaliado o potencial regenerativo em condições de osteoporose, com e sem o uso de AZ comparado a um grupo controle saudável. Ratas ovariectomizadas são consideradas um excelente modelo pré-clínico para estudos de osteoporose, pois simula claramente o quadro metabólico da doença assim como a resposta às terapias (JEE; YAO, 2001), sendo amplamente utilizado, é recomendado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para pesquisas sobre o tema (TURNER, 2001; EGERMANN *et al.*, 2005). A ovariectomia (OVX) é necessária tendo em vista que osteoporose ocorre de forma espontânea somente em humanos e em alguns primatas (GLOSEL *et al.*, 2010). Associando-se OVX a uma dieta hipocálcica, ocorre maior potencial de causar redução de DMO, tanto em osso cortical como medular (LILL *et al.*, 2002), enquanto ovariectomia, de forma isolada, apresenta mais potencial de redução óssea em osso medular somente (SHEN *et al.*, 1995). OVX provoca a redução dos níveis de estrógeno em animais, causando osteoporose e simulando os eventos da menopausa de humanos (TURNER, 2001). A osteoporose é multifatorial, podendo ser induzida, em estudos *in vivo*, por hormônios, fatores de crescimento, citocinas, agentes farmacológicos e por estímulos de suspensão de

exercícios físicos por imobilidade (BELLIDO; PLOTKIN, 2011). Porém ovariectomia e dieta hipocálcica foram as escolhas feitas, pelo autores deste estudo, como as mais viáveis para a execução desta pesquisa. Foram utilizadas amostras com ratas de 6 meses de idade, no início do estudo, pois acredita-se que a resposta à indução da osteoporose seja mais eficaz do que em animais mais novos (FRANCISCO *et al.*, 2001; LELOVAS *et al.*, 2008). Osteoporose pode ser confirmada através de mudanças morfológicas avaliadas histologicamente, como o aumento nos espaços medulares e do volume adiposo entre as trabéculas do tecido ósseo (VERNA *et al.*, 2002; LELOVAS *et al.*, 2008).

Segundo Donos *et al.* (2015) características fisiológicas e anatômicas devem ser levadas em conta para as demandas de um estudo. Ratos e outros pequenos animais são fáceis de manipular, cuidar e apresentam um bom controle genético, evitando alterações que possam repercutir em diferentes características entre animais da mesma amostra. Apesar de não ser possível extrapolar os resultados das pesquisas com animais diretamente para uso em humanos, é o ponto de partida para tal (DONOS *et al.*, 2015).

Veigel *et al.* (2013) realizou uma revisão sistemática em defeitos críticos concluindo que, apesar de considerar necessário mais estudos para estandardizar modelos em calvária de ratos, defeitos de 5 mm podem ser considerados críticos (CSD), ou seja, não tem potencial de regenerar de forma espontânea. A área operada de escolha foi a calvária, sendo que foram realizados defeitos de 5 mm de diâmetro pois esta dimensão permite realizar duas cavidades, bilateralmente, uma teste e outra controle. No presente estudo, em nenhuma das amostras controle, ocorreu regeneração óssea com o fechamento completo das cavidades, em ambos os períodos de observação, 30 e 60 dias. Somente limitada quantidade de osso foi formada, nas bordas dos defeitos, não havendo diferenças estatísticas entre os grupos, comprovando que os defeitos ósseos criados, nesta pesquisa, são comprovadamente críticos e estão de acordo com outras publicações na literatura (MARDAS *et al.*, 2002; DONOS *et al.*, 2004; STAVROPOULOS *et al.*, 2015). CSD são modelos amplamente utilizados e permitem avaliar ROG de maneira padronizada (DONOS *et al.*, 2015).

Membranas densas não expandidas e microporosas de PTFE

(politetrafluoretileno) foram utilizadas para ROG, nos defeitos teste, sendo responsáveis pela formação de novo osso ($p=0.000$) quando comparado ao controle, deixado sem membranas. Os resultados confirmam dados prévios de que membranas de PTFE promovem ROG e são adequadas para este objetivo (MAROUF; EL-GUINDI 2000, DONOS *et al.*, 2011). No presente estudo foi utilizada a técnica de duas membranas, uma interna, sobre a dura-máter e outra, externa, em contato com o perióstio, estando tal protocolo de acordo com estudos prévios (DONOS *et al.*, 2004; DONOS *et al.*, 2015). Existem duas gerações de membranas de PTFE, as não expandidas (n-PTFE), utilizadas neste estudo, e as expandidas (e-PTFE), sendo que as últimas são consideradas melhores para adaptação dos tecidos moles, pela macroporosidade da sua superfície. Por outro lado, estudos demonstraram maior risco de contaminação precoce devido à porosidade, comprometendo a ROG sob tais membranas (DONOS *et al.*, 2002). Apesar de amplamente utilizadas, não existem confirmações na literatura sobre a superioridade de um tipo de membrana de PTFE sobre a outra (CARBONELL *et al.*, 2014). Membranas de n-PTFE apresentam resistência estrutural que permite um adequado potencial oclusivo, evitando que a mesma colabe dentro do CSD, o que causaria diminuição da área, influenciando negativamente na ROG. Somado a isso, por serem não reabsorvíveis, permitem um melhor controle sobre o tempo de sua permanência ao longo de todo o período experimental (CARBONELL *et al.*, 2014).

Dados histológicos do presente estudo mostram que a osteoporose induzida em ratas ovariectomizadas provocou um efeito negativo moderado na regeneração óssea (tabela 4, artigo 1). A formação de novo osso em animais OVX foi menor tanto em amostras com ROG como nas que não receberam membranas, em ambos os tempos de observação, quando comparados com animais controle (C). Nos defeitos tratados com ROG de animais OVX houve diferenças qualitativas comparando-os com animais saudáveis, caracterizando-se em espaços medulares maiores, preenchidos por adipócitos, além de sua cortical apresentar-se mais fina. Os dados deste estudo pré-clínico estão de acordo com outros que identificaram alterações na cicatrização óssea em fraturas de ossos longos (NAMKUNG-MATHAI *et al.*, 2001; OLIVER *et al.*, 2013), de enxertos ósseos (KIM *et al.*, 2004) assim como na formação óssea além do envelope do esqueleto (MARDAS *et al.*, 2011) em animais ovariectomizados. Por outro lado, ao

contrário do presente estudo, outros não demonstraram um efeito negativo da osteoporose sobre fraturas de ossos longos (KUBO *et al.*, 1999), enxertos ósseos (NASCIMENTO *et al.*, 2009) ou sobre a osseointegração de implantes dentários. Muitas variáveis podem influenciar a existência de resultados divergentes, como o tipo de modelo animal adotado (TURNER, 2001; EGERMANN *et al.*, 2005), a idade, a região anatômica, o tempo de OVX (GLÖSEL *et al.*, 2010; LELOVAS *et al.*, 2008; FRANCISCO *et al.*, 2011), as dimensões, a localização dos defeitos assim como a metodologia utilizada para avaliação da regeneração (GLÖSEL *et al.*, 2010).

No presente estudo, ácido zoledrônico (AZ) foi aplicado em um dos grupos teste, como forma de tratamento para a osteoporose. Observou-se que o fármaco foi responsável por aumentar a espessura trabecular e diminuir os espaços medulares dos animais osteoporóticos, de forma estatisticamente significativa ($p=0,001$), quando comparados ao grupo osteoporótico que não recebeu tratamento com o fármaco. Resultados semelhantes já foram descritos, em tratamentos locais de superfícies de implantes, com AZ, demonstrando aumento na densidade do osso periimplantar assim como no torque de remoção de implantes (PETER *et al.*, 2006; STADELMANN *et al.*, 2009). Åstrand *et al.* (2006) demonstrou que administração sistêmica de AZ preveniu a reabsorção de enxerto alógeno e aumentou a estabilidade do tecido ósseo regenerado, dentro de câmeras ósseas criadas cirurgicamente, em tíbias de ratas. BF age, primariamente, sobre os osteoclastos, provocando a sua apoptose, reduzindo a reabsorção do tecido ósseo e, tendo em vista que este evento está diretamente ligado à neoformação, ocorre uma redução na taxa de remodelamento ósseo (MARX, 2007). Porém alguns estudos *in vivo* e *in vitro* colocaram em discussão a ação do BF somente sobre os osteoclastos, sugerindo que bisfosfonatos podem agir estimulando a diferenciação e proliferação de células osteogênicas, o que resulta no aumento da mineralização do tecido ósseo (BELLIDO; PLOTKIN, 2011). Dados *in vitro* suportam a hipótese que BF estimulam a formação de osteoblastos que, por sua vez, através da liberação de fatores celulares, inibem a formação de osteoclastos (PAPAPOULOS *et al.*, 2009). Por outro lado, estudos associam a presença de BF diretamente ligada à inibição da diferenciação de osteoblastos (ORRISS *et al.*, 2009). Esta contradição pode ser causada pelas diferentes concentrações do fármaco nos diferentes estudos, sendo

que o efeito proliferativo do BF sobre os osteoblastos ocorreu em concentrações menores (BELLIDO; PLOTKIN, 2011). Análises realizadas em humanos apontaram para um aumento nas taxas de deposição mineral, ao utilizarem AZ por 3 anos (RECKER *et al.*, 2008). Segundo Bellido e Plotkin (2011) as evidências sugerem que BF influenciam positivamente na formação óssea, mesmo causando diminuição do remodelamento do tecido duro, agindo diretamente sobre os osteoblastos e osteócitos, não somente nos osteoclastos.

No presente estudo utilizamos uma dose única de AZ, assim como Li *et al.* (2014), que demonstrou redução na expressão do gene associado à diferenciação de adipócitos, reduzindo a adipócitogênese no tecido ósseo medular, em modelo de ratas osteoporóticas. As células mesenquimais indiferenciadas da medula são multipotentes, ou seja, podem diferenciar-se em osteoblastos, adipócitos e fibroblastos, entre outros. A diferenciação em adipócitos provoca supressão da diferenciação dos osteoblastos, sendo que sinais intracelulares de formação e remodelamento (fator de transcrição 2) são suprimidos (MURUGANANDAN *et al.*, 2009). A possível ação anti adipócitogênica do AZ pode contribuir para o seu efeito anabólico, estimulando a mineralização através de um volume maior de células que se diferenciam em osteoblastos. Knoch *et al.* (2005), em um estudo *in vitro*, testou o uso de AZ em células medulares mesenquimais indiferenciadas e obteve como resultado efeito anabólico de estímulo da expressão de genes responsáveis pela diferenciação destas células em osteoblastos, além da inibição das atividades osteoclásticas. BF apresentam grande afinidade por osteoblastos, que, em contato com o fármaco, permitem a sua penetração celular através da abertura de hemicanais na membrana celular, resultando na ativação de ERKs (*extracellular signal-regulated kinases*), que são quinases. Estas quinases são as moléculas responsáveis por transferir grupos fosfato (fosforilação) para moléculas alvo dentro da célula e que causarão um retardo na morte celular dos osteoblastos. Ainda não foi possível identificar seguramente qual é o receptor que liga os BF à membrana extracelular dos osteoblastos (BELLIDO; PLOTKIN, 2011). Nosso grupo de pesquisa não foi avaliou o efeito do AZ em animais saudáveis, para critério de comparação, tendo em vista que não tínhamos um grupo controle que recebera AZ. Porém é de longa data a observação de que quando BF não são administrados em excesso,

espera-se efeito de melhora nas propriedades biomecânicas do tecido ósseo, tanto em modelos de animais osteoporóticos quanto em animais saudáveis (FERRETTI *et al.*, 1995).

Publicada pela primeira vez em 2003 (MARX, 2003), osteonecrose dos maxilares (ON) está associada ao crescente número de pacientes medicados com bisfosfonatos, especialmente aos que são submetidos a cirurgias orais. A maior incidência dos casos de ON ocorre em pacientes com câncer, expostos ao AZ, na dose usual de 4 mg a cada 3 semanas, endovenoso. O risco relativo destes pacientes em desenvolverem ON é de 50-100 vezes quando comparados a pacientes medicados com placebo. Por outro lado, uma dose anual (5mg/ano), para tratamento de osteoporose, parece ter o mesmo efeito causal de ON do que o placebo, apresentando uma incidência de 0,017-0,04%, enquanto que os pacientes com câncer medicados com AZ apresentaram ONJ em 0,7–6,7% dos casos (RUGGIERO *et al.*, 2014). Demais publicações descrevem comprometimento da cicatrização do tecido ósseo, em sítios pós extração, após doses endovenosas repetidas de AZ em ratos (HIKITA *et al.*, 2009) e em cães (ALLEN *et al.*, 2010).

A duração e a dose de AZ administrada em ratos (SILVA *et al.*, 2015) e em humanos (RUGGIERO *et al.*, 2014) pode influenciar na ocorrência de ON nos maxilares. Segundo Russel (2007) a dose total de BF é o fator determinante dos seus efeitos farmacológicos. Em um ensaio clínico randomizado, duplo cego, Black *et al.* (2007) comparou dois grupos de pacientes osteoporóticos. Uma dose anual de AZ foi administrada em 3889 pacientes enquanto o grupo controle, com 3876 indivíduos, recebeu uma dose de placebo. Os autores concluíram que a dose única de AZ foi capaz de reduzir o risco de fraturas vertebrais em até 70%, sendo os efeitos colaterais semelhantes para ambos os grupos. Acreditamos que o uso de uma pequena e única dose de AZ (0,1mg/kg) mostrou-se eficaz em reduzir os efeitos da osteoporose e que, somado ao fato de a região anatômica utilizada no presente experimento foi a calota craniana, sejam as possíveis explicações para a ausência absoluta de sinais de osteonecrose ou qualquer tipo de evidência de comprometimento cicatricial, estando de acordo com estudos prévios (LI *et al.*, 2014a; SILVA *et al.*, 2015).

Avaliações dos efeitos dos bisfosfonatos sobre osteoblastos e osteócitos são

necessárias para um melhor entendimento do potencial benéfico desta droga, em variadas dosagens. Assim, os resultados desta pesquisa devem ser avaliados levando-se em conta que não é possível extrapolar os dados aqui apresentados para humanos. Pesquisas em animais de maior porte e em humanos são necessárias. Desta maneira será possível desvelar as propriedades e limitações destes materiais que, no momento, podem trazer alento ou preocupação para os que dele fazem uso. No entender dos autores deste estudo, existe campo fértil para futuras investigações e aplicação clínica em um prazo não muito longo.

6. CONCLUSÕES

A partir dos dados do presente estudo pode-se concluir que:

1. Membranas n-PTFE são capazes de promover ROG de defeitos críticos em calvárias de ratas tanto osteoporóticas quanto saudáveis. A osteoporose não influenciou as propriedades da membrana, embora qualitativamente o tecido ósseo se apresentasse menos estruturado que nas ratas não osteoporóticas.
2. Tratamento com uma dose única de ácido zoledrônico parece influenciar de forma positiva a regeneração óssea na presença de osteoporose.

7. REFERÊNCIAL TEÓRICO

Abu-Id MH, Warnke PH, Gottschalk J, Springer I, Wiltfang J, Acil Y, et al. “Bis-phossy jaws” — high and low risk factors for bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *J Cranio-Maxillofac Surg.* 2008; 36:95–103.

Anderson DC. Osteoporosis in men. *BMJ.* 1992;305:489-490.

Aguirre, JI, Akhter, MP, Kimmel, DB, Pingel, JE, Williams, A., Jorgensen, M., Kesavalu, L, Wronski, TJ. Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in rice rats (*Oryzomys palustris*) with periodontitis. *J Bone Miner Res.* 2012;27:2130-2143.

Allen MR, Kubek DJ, Burr DB. Cancer treatment dosing regimens of zoledronic acid result in near-complete suppression of mandible intracortical bone remodeling in beagle dogs. *JBMR.* 2010;25:98–105.

Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. WHO. Technical Report Series.No.843. Geneva,1994.

Åstrand O, Kajsa-Harding A, Aspenberg P, Tägil M. Systemic zoledronate treatment both prevents resorption of allograft bone and increases the retention of new formed bone during revascularization and remodelling. A bone chamber study in rats. *BMC Musculoskeletal Disorders.* 2006;7:63.

Avolio G, Brandão CMA, De Oliveira JX, Costa C, Alonso G. O papel da vitamina D₃ e da osteocalcina no metabolismo ósseo: uma análise necessária para se otimizar a ossteointegração. *Rev Inst Ciênc Saúde.* 2008; 26(3): 347-50.

Bagan JV, Jimenez Y, Diaz JM, Murillo J, Sanchis JM, Poveda R, et al. Jaw

osteonecrosis associated with bisphosphonates: multiple exposed areas and its relationship to teeth extractions. Study of 20 cases. *Oral Oncology*. 2006;42:327-9.

Barber HD, Lignelli J, Smith BM, Bartee BK. Using a dense PTFE membrane without primary closure to achieve bone and tissue regeneration. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007; 65:748–52.

Bartee BK. The use of high-density polytetrafluoroethylene membrane to treat osseous defects: clinical reports. *Implant Dent*. 1995;4:21–6.

Bartee BK. A membrane and graft technique for ridge maintenance using high-density polytetrafluoroethylene (n-PTFE) and hydroxylapatite: report of four cases. *Tex Dent J*. 1995;112:7–16.

Beatrice E, Hellstein JW, Peter JL, Kaltman S, Mariotti A, Migliorati C. Updated recommendations for managing the care of patients receiving oral bisphosphonate therapy: An advisory statement from the American Dental Association Council on Scientific Affairs for the American Dental Association Council on Scientific Affairs Expert Panel on Bisphosphonate- Associated Osteonecrosis of the Jaw. *JADA*. 2008;139(12):1674-1677.

Becker W, Hujuel PP, Becker BE, Willingham H. Osteoporosis and implant failure: an exploratory case-control study. *J Periodontol*. 2000;71(4):625-631.

Becmeur, F., Geiss, S., Laustriat, S., Bientz, J., Marcellin, L. & Sauvage, P. History of Teflon. *European Urology* 1990;17: 299–300.

Bellido, T. Plotkin, L.I. Novel actions of bisphosphonates in bone: Preservation of osteoblast and osteocyte viability *Bone*.2001;49: 50–55.

Benisch, P., Schilling, T., Klein-Hitpass, L., Frey, S.P., Seefried, L., Raaijmakers, N. et

al. (2012) The transcriptional profile of mesenchymal stem cell populations in primary osteoporosis is distinct and shows overexpression of osteogenic inhibitors. *PLoS One* 7(9):e45142.

Black MD, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA. et al. Once-Yearly Zoledronic Acid for Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. *The New England Journal of Medicine*. 2007;356(18):1809-22.

Borromeo GL, Tsao CE, Darby IB, Ebeling PR. A review of the clinical implications of bisphosphonates in dentistry. *Aust Dent J*. 2010;56: 2–9.

Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Guided bone regeneration in calvarial bone defects using polytetrafluoroethylene membranes. *Cleft Palate Craniofac J*. 1995;32:311-17.

Burchardt H. Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am*. 1987; 18:187-196.

Buser D, Chappuis V, Bornstein M, Wittneben JG, Frei M, Belser, UC. Long-term stability of contour augmentation with early implant placement following single tooth extraction in the esthetic zone: a prospective, cross-sectional study in 41 patients with a 5- to 9-year follow-up. *J Periodontol*. 2013;84(11):1117-1127.

Busetti J, Polido W. Osteonecrose de maxila, em região de implantes, associada ao uso endovenoso de bisfosfonato. *Rev. Dental Press Periodontia Implantol*. 2008;2(3):93-102.

Carbonell JM, Sanz Martin I, Santos A, Pujol A, Sanz-Moliner JD, Nart J. High-density polytetrafluorethylene membranes in guided bone and tissue regeneration procedures: a literature review *Int. J. Oral Maxillofac. Surg*. 2014;43:75–84.

Chan HL, Lin GH, Suarez F, MacEachern M, Wang HL. Surgical management of peri-implantitis: a systematic review and meta-analysis of treatment outcomes. *J Periodontol*.

2014;85:1027-1041.

Charatcharoenwitthaya N, Khosla S, Atkinson EJ, McCready LK, Riggs BL. Effect of blockade of TNF-alpha and interleukin-1 action on bone resorption in early postmenopausal women. *JBMR*. 2007;22(5):724-729.

Cowles EA, De Rome ME, Pastizzo G, Brailey LL, Gronowicz GA. Mineralization and the expression of matrix proteins during in vivo bone development. *Calcif Tissue Int*. 1998;62:74-82.

Crump TB, Rivera-Hidalgo F, Harrison JW, Williams FE, Guo IY. Influence of three membrane types on healing of bone defects. *Oral Surg Oral Med O*. 1996;82: 365–374.

Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1988;81:672–676.

Dahlin C, Alberius P, Linde A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *J Neurosurg*. 1991;74:487–491.

Dental Management of Patients Prescribed Bisphosphonates – NHS Clinical Guidance, January 2015. Disponível em: <http://www.england.nhs.uk/mids-east/wp-content/uploads/sites/7/2015/03/bisphosphonates-guidelines-2015.pdf>)

Dervis E. Oral implications of osteoporosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;100:349-356.

Donos N, Graziani F, Mardas N, Kostopoulos, L. The use of human hypertrophic chondrocytes extracellular matrix for the treatment of critical-size defects in rats. *Clin Oral Impl Res*. 2001;22:1346-1353.

Donos N, Kostopoulos L, Karring T. Augmentation of the rat jaw with autogeneic cortico-cancellous bone grafts and guided tissue regeneration. *Clin Oral Impl Res.* 2002a;13:192–202.

Donos N, Kostopoulos L, Karring T. Alveolar ridge augmentation by combining autogenous mandibular bone grafts and non-resorbable membranes. *Clin Oral Impl Res.* 2002b;13:185–191.

Donos N, Lang NP, Karoussis IK, Bosshardt D, Tonetti M, Kostopoulos L. Effect of GBR in combination with deproteinized bovine bone mineral and/or enamel matrix proteins on the healing of critical size defects. *Clin Oral Impl Res.* 2004;15:101-111.

Donos N, Mardas N, Chadha V. Clinical outcomes of implants following lateral bone augmentation: systematic assessment of available options (barrier membranes, bone grafts, split osteotomy). *J Clin Periodontol.* 2008;35: 173–202.

Donos N, Graziani F, Mardas N, Kostopoulos, L. The use of human hypertrophic chondrocytes extracellular matrix for the treatment of critical-size defects in rats. *Clin Oral Impl Res.* 2011;22:1346-1353.

Donos N, Calciolari E. Dental implants in patients affected by systemics diseases. *Br. Dent J.* 2014;Oct;217(8):425-30.

Donos N, Dereka X, Mardas N. Experimental models for guided bone regeneration in healthy and medically compromised conditions. *Periodontol 2000.* 2015;68(1):99–121.

Durie BGM, Katz M, Crowley J. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates. *N Engl J Med.* 2005;353:99–10.

Edwards BJ, Gounder M, McKoy JM, Boyd I, Farrugia M, Migliorati C, et al. Pharmacovigilance and reporting oversight in US FDA fast-track process: bisphosphonates and

osteonecrosis of the jaw. *Lancet Oncology*. 2008;9(12):1166–72.

Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporosis Int*. 2005;16(2):S129–S138.

Ejiri S, Tanaka M, Watanabe N, Anwar RB, Yamashita E, Yamada K, Ikegame M. Estrogen deficiency and its effect on jaw bones. *J Bone Miner Metab*. 2008;26:409-415.

Erdogan Ö, Shafer DM, Taxel P, Freilich MA. A review of the association between osteoporosis and alveolar ridge augmentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;104(6):738.e1-13.

Eriksen EF, Díez-Pérez A, Boonen S. Update on long-term treatment with bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis: a systematic review. *Bone*. 2014;58: 126–135.

Estilo CL, Van Poznak CH, Williams T, Bohle GC, Lwin PT, Zhou Q, et al. Osteonecrosis of the maxilla and mandible in patients with advanced cancer treated with bisphosphonate therapy. *The Oncologist*. 2008;13, 911–20.

Ferguson CM, Miclau T, Hu D, Apeine E, Helms JA. Common molecular pathways in skeletal morphogenesis and repair. *Ann NY Acad Sci*. 1998;857:839-850.

Fernandes CE, Wehba S, Melo NR, Machado RB. Osteoporose pós-menopáusia. In: *Climatério Feminino: fisiopatologia, diagnóstico e tratamento*. 1ª Ed., Lemos, 1999. Editora:93-139.

Ferraz CC, Gomes NV, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Apical extrusion of debris and irrigants using two hand and three engine-driven instrumentation techniques. *Int Endod J*. 2001;34:354–8.

Ferretti JL, Bijvoet O, Fleisch HA, Canfield RE, Russell RGG. Effects of bisphosphonates on bone biomechanics eds. In: Bisphosphonates on Bone. 1995; Amsterdam, Holland: Elsevier Science;211–229.

Fischer KR, Stavropoulos A, Calvo-Guirado JL, Schneider D, Fickl S. Influence of local administration of pamidronate on extraction socket healing – a histomorphometric proof-of-principle pre-clinical in vivo evaluation. *Clin Oral Impl Res.* 2015;26:1135-1142.

Fini M, Giavaresi G, Torricelli P, Borsari V, Giardino R, Nicolini A, Carpi A. Osteoporosis and biomaterial osteointegration. *Biomed & Pharmacother.* 2004;58:487-493.

Fini M, Nicoli Aldini N, Gandolfi MG, Mattioli Belmonte M, Giavaresi G, Zucchini C, De Benedittis A, Amati S, Ravaglioli A, Krayewski A, Rocca M, Guzzardella GA, Biagini G, Giardino R. Biomaterials for orthopedic surgery in osteoporotic bone: a comparative study in osteopenic rats. *Int J Artif Organs.* 1997;20:291-7.

Francisco JI, Yu Y, Oliver RA, Walsh WR. Relationship between age, skeletal site, and time post-ovariectomy on bone mineral and trabecular microarchitecture in rats. *J Orthopaed Res.* 2011;29:189-196.

Gallego L, Junquera L, Pelaz A, Díaz-Bobes C. Rubber Dam Clamp Trauma During Endodontic Treatment: A Risk Factor of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw? *J Oral Maxillofac Surg.* 2011;69:e93-e95.

Gegler A, Cherubini K, Figueiredo MAZ, Yurgel LS, Azambuja AA. Bisfosfonatos e osteonecrose maxilar: revisão de literatura e relato de dois casos. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 2006; 52(1): 25-31.

Glösel I B, Kuchler U, Watzek G, Gruber R. Review of dental implant rat research models simulating osteoporosis or diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2010;25:516-524.

Gosain AK, Song L, Yu P, Mehrara BJ, Maeda CY, Gold LI, Longaker MT. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. *Plast Reconstr Surg.* 2000;106:360–372.

Gottlow J. Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices: Initial healing and long-term results. *J Periodontol.* 1993; 64:1157–1165.

Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol.* 1984;11:494-503.

Graham R, Russell G, Espina B, Hlley P. Bone biology and the pathogenesis of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 2006;18(suppl 1):S3–S10.

Graham R, Russell G. Bisphosphonates: Mode of Action and Pharmacology *Paediatrics* 2007;119(S2):S150 - S162.

Gupta S, Gupta H, Mandhyan D, Srivastava S. Bisphosphonates related osteonecrosis of the jaw. *Natl J Maxillofac Surg.* 2013 Jul-Dec; 4(2): 151–158.

Hämmerle CH, Schmid J, Lang NP, Olah AJ. Temporal dynamics of healing in rabbit cranial defects using guided bone regeneration. *Int J Oral Max Surg.* 1995;53:167–174.

Hämmerle CHF, Chiantella GC, Karring T, Lang NP. The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants. *Clin Oral Impl Res.* 1998;9:151–162.

Hämmerle, C.H.F. & Lang, N.P. Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioresorbable materials. *Clin Oral Impl Res.* 2001;12:9–18.

Hämmerle CH, Jung RE. Bone augmentation by means of barrier membranes.

Periodontol 2000. 2003;33:36–53.

Hernlund E, Svedbom A, Ivergard M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, McCloskey EV, Jonsson B, Kanis JA. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos*. 2003;8(136):6-8.

Hikita H, Miyazawa K, Tabuchi M, Kimura M, Goto S. Bisphosphonate administration prior to tooth extraction delays initial healing of the extraction socket in rats. *JBMM*. 2009;27:663–672.

Hsiao A, Glickman G, He J. A Retrospective Clinical and Radiographic Study on Healing of Periradicular Lesions in Patients Taking Oral Bisphosphonates. *JOE*. 2009; 11:1525-1528.

Horvath A, Mardas N, Mezzomo LA, Needleman IG, Donos N. Alveolar ridge preservation. A systematic review. *Clin Oral Invest*. 2013;17:341-363.

Hoff AO, Toth BB, Altundag K, Johnson MM, Warneke CL, Hu M et al. Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. *J Bone Miner Res*. 2008;23 (6):826–36.

Hurley LA, Stinchfield FE, Bassett AL, Lyon WH. The role of soft tissues in osteogenesis. An experimental study of canine spine fusions. *J Bone Joint Surg Am*. 1959;41(A):1243–1254.

Hürzeler MB, Kohal RJ, Naghshbandi J, Mota LF, Conradt J, Hutmacher D, Caffesse RG. *Int J Oral Max Surg*. 1998; 27(4);315-320.

Ito K, Nanba K, Murai S. Effect of bioabsorbable and non-resorbable barrier membranes

on bone augmentation in rabbit calvaria. *J Periodontol.* 1998;69:1229–1237.

Jeffcoat M. The association between osteoporosis and oral bone loss. *J Periodontol.* 2005;76:2125-2132.

Jeffcoat MK, Lewis CE, Reddy MS, Wang C-Y, Redford M. Post-menopausal bone loss and its relationship to oral bone loss. *Periodontol 2000.* 2000;23:94-102.

Jee WSS, Yao W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskel Neuron Interact.* 2001;1(3):193-207.

Jilka RL. Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update. *Bone.*1998;23(2): 75-81.

Jilka RL. Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Med Pediatr Oncol.* 2003;41(3):182-185.

Jimi E, Hirata S, Osawa K, TERashita M, Kitamura C, Fukushima H. The Current and Future Therapies of Bone Regeneration to Repair Bone Defects. *Int J Dent.* 2012;2012:1-7.

Jung RE, Fenner N, Hämmerle CH, Zitzmann NU. Long-term outcome of implants placed with guided bone regeneration (GBR) using resorbable and non-resorbable membranes after 12-14 years. *Clin Oral Impl Res.*2013;24: 1065-1073.

Kalu DN. The ovariectomised rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* 1991;15:175–192.

Karring T, Nyman S, Lindhe J. Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. *J Clin Periodontol.* 1980;7:96-105.

Karring T, Nyman S, Lindhe J, Sirirat M. Potential for root resorption during periodontal healing. *J Clin Periodontol*. 1984;11:41-52.

Karring T, Nyman S, Gottlow J, Laurell L. Development of the biological concept of guided tissue regeneration-animal and human studies. *Periodontol 2000*. 1993;1:26-35.

Kassem M, Marie PJ. Senescence-associated intrinsic mechanisms of osteoblast dysfunctions. *Aging Cell*. 2011;10(2): 191-197.

Khan AA, Morrison A, Hanley DA, Felsenberg D, McCauley LK, O’Ryan F, et al. Diagnosis and Management of Osteonecrosis of the Jaw: A Systematic Review and International Consensus. *J Bone Miner Res*. 2015;30(1):3–23.

Kim SY, Kim SG, Lim SC, Bae CS. Effects on bone formation in ovariectomized rats after implantation of tooth ash and plaster of Paris mixture. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004;62(7):852-7.

Klemetti E, Vainio P, Lassila A, Alhava E. Cortical bone mineral density in the mandible and osteoporosis status in postmenopausal women. *Scand J Dent Res*. 1993;101:219-23.

Knoch FV, Jaquier 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):6941–6949.

Kramer FJ, Schliephake H, Wichmann M. Endosseous implants for functional masticatory rehabilitation in the extremely atrophied edentulous maxilla. *Mund Kiefer Gesichtschir*. 1999;3:19-23.

Krauser JT. High-density PTFE membranes: uses with root-form implants. *Dent Implantol Update*. 1996;7:65–9.

Kubo T, Shiga T, Hashimoto J, Yoshioka M, Honjo H, Urabe M, et al. Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999;68(5-6):197-202.

Kühl S, Walter C, Acham S, Pfeffer R, Lambrecht JT. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws - a review. *Oral Oncol.* 2012;48:938-947.

Kwon YD, Ohe JY, Kim DY, Chung DJ, Park YD. Retrospective study of two biochemical markers for the risk assessment of oral bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: can they be utilized as risk markers? *Clin Oral Implants Res.* 2011;22:100–5.

Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comparative Med.* 2008;58:424-430.

Li GW, Xu Z, Chang SX, Zhou L, Wang XY, Nian H, Shi X. Influence of early zoledronic acid administration on bone marrow fat in ovariectomized rats. *Endocrinology.* 2014a;155: 4731-4738.

Li CL, Lu WW, Seneviratne CJ, Leung WK, Zwahlen RA, Zheng LW. Role of periodontal disease in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in ovariectomized rats. *Clin Oral Impl Res.* 2014b;00:1-9

Linde A, Thoren C, Dahlin C, Sandberg E. Creation of new bone by an osteopromotive membrane technique: an experimental study in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1993;51:892–897.

Luize DS, Bosco AF, Bonfante S, de Almeida JM. Influence of ovariectomy on healing of autogenous bone block grafts in the mandible: a histomorphometric study in an aged rat model. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008;23:207-214.

Lundgren AK, Sennerby L, Lundgren D. Guided jaw-bone regeneration using an

experimental rabbit model. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1998;27:135–140.

Mackie EJ. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35:1301-1305.

Mardas N, Kostopoulos L, Karring T. Bone and suture regeneration in calvarial defects by e-PTFE-membranes and demineralised bone matrix and the impact on calvarial growth: an experimental study in the rat. *J Craniofac Surg.* 2002;13:453-462.

Mardas N, Chadha V, Donos N. Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovine-derived xenograft: A randomized, controlled clinical trial. *Clin Oral Impl Res.* 2010;21: 688-698.

Mardas N, Schwartz F, Petrie A, Hakimi A-R, Donos N. The effect of SLActive surface in guided bone formation in osteoporotic-like conditions. *Clin Oral Impl Res.* 2011;22:406-415.

Mardas N, Trullenque-Eriksson A, MacBeth N, Petrie A, Donos N. (2015) Does ridge preservation following tooth extraction improve implant treatment outcomes: a systematic review: Group 4: Therapeutic concepts & methods *Clinical Oral Implants Research* Jun 16. doi: 10.1111/clr.12639. [Epub ahead of print]

Marks SC, Odgren PR. Structure and development of the skeleton. In Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (Eds.). *Principles of bone biology* 2002;1:3-15. San Diego: Academic Press.

Marouf HA, El-Guindi HM. Efficacy of high-density versus semipermeable PTFE membranes in an elderly experimental model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000;89:164–70.

Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of

the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003;61:1115-7.

Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63(11):1567-1575.

Marx RE. Oral & Intravenous Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaws: Histology, Etiology, Prevention and Treatment. Illinois: Quintessence books. 2007:1-95.

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;65:2397- 2410.

Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol.* 1976;47: 256–260.

Mhaskar R, Redzepovic J, Wheatley K, Clark OAC, Miladinovic B, Glasmacher A, et al. Bisphosphonates in multiple myeloma: a network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;16:CD003188.

Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ. Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell Mol. Life Sci.* 2009;66:236–253.

Monteiro AS, Macedo LG, Macedo NL, Balducci I. Polyurethane, and PTFE membranes for guided bone regeneration: histopathological and ultrastructural evaluation. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010;15:401–6.

Mulliken JB, Glowacki J. Induced osteogenesis for repair and construction in the craniofacial region. *Plast Reconstr Surg.* 1980;65(5):553-60.

Moy PK, Medina D, Shetty V, Aghaloo TL. Dental implant failure rates and associated

risk factors. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005;20(4):569-577.

Moinzadeh AT, Shemesh H, Neiryneck NAM, Aubert C, Wesselink PR. Bisphosphonates and their clinical implications in endodontic therapy. *International Endodontic Journal*. 2013;46, 391–8.

Murray G, Holden R, Roshlau, W. Experimental and clinical study of new growth of bone in a cavity. *American Journal of Surgery* 1957;93:385–387.

Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, Hao Lin J, Maastricht S, Swain M, Mason RS, Murrell GAC, Diwan AD, Diamond T. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone*. 2001;28(1);80-86.

Nascimento RD, Cardoso PE, Marco AC, de Lima LAP, Jardini MAN. Influence of osteopenia in autogenous bone graft healing with or without expanded polytetrafluoroethylene membranes: Histologic and histomorphometric study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009;24:1074-1082.

National Osteoporosis Foundation. America's bone health: the state of osteoporosis and low bone mass in our nation. Washington (DC): National Osteoporosis Foundation; 2002.

Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1982;9:290–296.

Oberg S, Johansson C, Rosenquist JB. Bone formation after implantation of autolysed antigen extracted allogeneic bone in ovariectomized rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2003;32(6):628-632.

Oliver RA, Yu Y, Yee G, Low AK, Diwan AD, Walsh WR. Poor histological healing of a femoral fracture following 12 months of oestrogen deficiency in rats. *Osteoporosis Int*.

2013;24:2581–2589.

Orriss IR, Key ML, Colston KW, Arnett TR. Inhibition of osteoblast function in vitro by aminobisphosphonates. *J Cell Biochem.* 2009; 106:109–18.

Papapoulos SE. Bisphosphonates for Postmenopausal Osteoporosis. In: Rosen C, editor. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.* 2009;p.237-41.

Patel S, Saberi N. External Cervical Resorption Associated with the Use of Bisphosphonates: A Case Series. *JOE.* 2015; 41(5):742-8.

Peter B, Gauthier O, Laïb S, Bujoli B, Guicheux J, Janvier P, Van Lenthe GH, Müller R, Zambelli PY, Bouler JM. Local delivery of bisphosphonate from coated orthopedic implants increases implants mechanical stability in osteoporotic rats. *J Biomed Mater Res.* 2006;Part A(76):133-143.

Recker RR, Delmas PD, Halse J, Reid IR, Boonen S, Garcia-Hernandez PA, Supronik J, Lewiecki EM, Ochoa L, Miller P, Hu H, Mesenbrink P, Hartl F, Gasser J, Eriksen EF. Effects of intravenous zoledronic acid once yearly on bone remodeling and bone structure. *J Bone Miner. Res.* 2008; 23:6–16.

Reid IR. Osteonecrosis of the jaw: who gets it, and why? *Bone.* 2009;44:4-10.

Retzepi M, Lewis MP, Donos N. Effect of diabetes and metabolic control on de novo bone formation following Guided Bone Regeneration. *Clin Oral Implan Res.* 2010;21:71–79.

Retzepi M, Donos N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21:567-576.

Ripamonti CI, Maniezzo M, Campa T, Fagnoni E, Brunelli C, Saibene G, et al.

Decreased occurrence of osteonecrosis of the jaw after implementation of dental preventive measures in solid tumor patients with bone metastases treated with bisphosphonates. The experience of the National Cancer Institute of Milan. *Ann Oncol*. 2008.

Rodriguez JP, Astudillo P, Rios S, Pino AM. Involvement of adipogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in osteoporosis. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2008;3(3): 208-218.

Ruedi TP, Bassett CA. Repair and remodeling in Millipore-isolated defects in cortical bone. *Acta Anat*. 1967;68:509–531.

Ruggiero SL, Fantasia J, Carlson E. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;102:433–41.

Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B for the Task Force on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws: American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper: Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws—2009 update: The need to refine the BRONJ definition. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67:2698-2709.

Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, O’Ryan F. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw-2014 update. *J Oral Maxil Surg*. 2014;72(10):1938-1956.

Russell RGG. Pathogenesis of osteoporosis. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen SJ, Weinblatt ME, Weisman MH, editors. *Rheumatology*, 3rd ed. New York: Mosby; 2003.pp.2075–2147.

Russell GG, Espina B, Hulley P. Bone biology and the pathogenesis of osteoporosis.

Curr Opin Rheumatol. 2006;18(1):S3-S10.

Russel RGG. Bisphosphonates: Mode of Action and Pharmacology. Pediatrics. 2007;119(2): S150-S162.

Russell RG. Determinants of structure-function relationships among bisphosphonates. Bone. 2007, 40:S21–5.

Sambrook P, Cooper C. Osteoporosis. Lancet. 2006;367:2010-18.

Sandberg E, Dahlin C, Linde A. Bone regeneration by the osteopromotion technique using bioabsorbable membranes: an experimental study in rats. Int J Oral Max Surg. 1993;51:1106–1114.

Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. Int J Oral Maxillofac Implants. 1994;9:13-29.

Schliephake H, Neukam FW, Wichmann M. Survival analysis of endosseous implants in bone grafts used for the treatment of severe alveolar ridge atrophy. J Oral Maxillofac Surg. 1997;55(11):1227-1233.

Schwarz F, Sahm N, Bieling K, Becker J. Surgical regenerative treatment of peri-implantitis lesions using a nanocrystalline hydroxyapatite or a natural bone mineral in combination with a collagen membrane: a four-year clinical follow-up report. J Clin Periodontol. 2009;36: 807-814.

Sculean A, Chapple ILC, Giannobile WV Wound models for periodontal and bone regeneration: the role of biologic research. Periodontol 2000. 2015;68:7–20.

Serrano AJ, Begoña L, Anitua E, Cobos R, Orive G. Systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of alendronate and zoledronate for the treatment of

postmenopausal osteoporosis. *Gynecol Endocrinol.* 2013;29: 1005–1014.

Shen V, Birchman R, Xu R, Lindsay R, Dempster DW. Short-term changes in histomorphometric and biochemical turnover markers and bone mineral density in estrogen-and/or dietary calcium-deficient rats. *Bone.* 1995;16:149-156.

Shimizu M, Furuyam R, Kawawam T, Sasaki T. Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats: quantitative backscattered electron image analysis. *Anat Rec.* 2000;259:76–85.

Silva PG, Ferreira Jr. AE, Teófilo CR, Barbosa MC, Lima Jr. RC, Sousa FB, Mota MR, Ribeiro RA, Alves AP. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. *Arch Oral Biol.* 2015;60:1237-1245.

Simion M, Baldoni M, Rossi P, Zaffe D. A comparative study of the effectiveness of e-PTFE membranes with and without early exposure during the healing period. *Int J Periodont Rest.* 1994;14:167– 180.

Simion M, Trisi P, Piattelli A. Vertical ridge augmentation using a membrane technique associated with osseointegrated implants. *Int J Periodont Rest.* 1994;14:496–511.

Simion, M., Dahlin, C., Blair, K. & Schenk, R.K. Effect of different microstructures of e-PTFE membranes on bone regeneration and soft tissue response: a histologic study in canine mandible. *Clin Oral Impl Res.* 1999;10:73–84.

Smith R, Russell RGG, Bishop M. Disphosphonates and Page's disease of bone. *Lancet.* 1971;1(7706):945– 947.

Silva PG, Ferreira Jr AE, Teófilo CR, Barbosa MC, Lima Jr RC, Sousa FB, Mota MR, Ribeiro RA, Alves AP. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. *Arch Oral Biol.* 2015;60:1237-1245.

Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999;341(10):738-746.

Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for cranio-mandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat R*. 1986;205:299–308.

Spin-Neto RL, Landazuri Del Barrio RA, Pereira LA, Marcantonio RA, Marcantonio E, Marcantonio E Jr. Clinical similarities and histological diversity comparing fresh frozen onlay bone blocks allografts and autografts in human maxillary reconstruction. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2013 Aug;15(4):490-7

Stadelmann VA, Terrier A, Gauthier O, Bouler JM, Pioletti DP. Prediction of bone density around orthopaedic implants delivering bisphosphonate. *J Biomech*. 2009;42:1206-1211.

Stavropoulos A, Sculean A, Bosshardt D, Buser D, Klinge B. Pre-clinical in vivo models for the screening of bone biomaterials for oral/craniofacial indications: focus on small-animal models. *Periodontol 2000*. 2015;68:55-65.

Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone*. 1995;17(4 Suppl):125S-133S.

Turner, AS. Animal models of osteoporosis—necessity and limitations. *European Cells & Materials*. 2001;1:66–81.

Toricelli P, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Human osteoblast cultures from osteoporotic and healthy bone: biochemical markers and cytokine expression in basal conditions and in response to 1.25(OH)₂ D₃. *Art Cells Blood Subs Immob Biotech*. 2002;30(3):219-227.

Tsolaki IN, Madianos PN, Vrotsos JA. Outcomes of dental implants in osteoporotic

patients. A literature review. *J Prosthodont.* 2009;18:309-323.

Turnbull RS, Freeman E. Use of wounds in the parietal bone fo the rat for evaluating bone marrow for grafting into periodontal defects. 1974; 9(1):39-43.

Urban IA, Nagursky H, Lozada JL, Nagy K. Horizontal ridge augmentation with a collagen membrane and a combination of particulated autogenous bone and anorganic bovine bone-derived mineral: a prospective case series in 25 patients. *Int J Periodont Rest.* 2013;33:299-307.

U.S. Department of Health & Human Services. A profile of Older Americans: 2014 – Administration on Ageing. Administration for Community Living. 2014; http://www.aoa.acl.gov/Aging_Statistics/Profile/2014/docs/2014-Profile.pdf.

Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Impl Res.* 2014;25(8):879-93.

Van Steenberghe D, 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 Implants Res.* 2002;13(6):617-622.

Verma S, Rajaratnam JH, Denton J, Hoyland JA, Byers RJ. Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis. *J Clin Pathol.* 2002;55:693-698.

Verna C, Dalstra M, Wikesjo UM, Trombelli L. Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats. A micro-CT scan analysis. *J Clin Periodontol.* 2002;29:865–870.

Vidigal GM Jr, Groisman M, Gregorio LH, Soares GA. Osseointegration of titanium alloy and HA-coated implants in healthy and ovariectomized animals: a histomorphometric

study. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20:1272-277.

Von Arx T, Buser D. (2006) Horizontal ridge augmentation using autogenous block grafts and the guided bone regeneration technique with collagen membranes: a clinical study with 42 patients. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17: 359-366.

Xiong H, Peng B, Wei L, et al. Effect of an Estrogen-deficient State and Alendronate Therapy on Bone Loss Resulting from Experimental Periapical lesions in Rats. *J Endod.* 2007;33:1304–8.

Yuen T, Stachnik A, Iqbal J, Sgobba M, Lu P, Colaianni G, et al. Bisphosphonates inactivate human EGFRs to exert antitumor actions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(50):17989-94.

Zellin G, Gritli-Linde A, Linde A. Healing of mandibular defects with different biodegradable and non-biodegradable membranes: an experimental study in rats. *Biomaterials.* 1995;16:601–609.

Zellin G, Hakanson R, Linde A. Gastrectomy has no effect on bone regeneration in rats despite a decrease in bone mass. *Scand J Gastroenterol.* 2002;37:1149-1155.

Zitzmann NU, Scharer P, Marinello CP. Long-term results of implants treated with guided bone regeneration: a 5-year prospective study. *Int J Oral Max Impl.* 2001;16: 355–366.

Zhu M, Liang L, Pan L, Huang B, Qian W, Zhong JH, Zheng WW, Li CL. Zoledronate for metastatic bone disease and pain: a meta-analysis of randomized clinical trials". *Pain Medicine.* 2013;14 (2):257–64.

Waasdorp J, Feldman S. Bone regeneration around immediate implants utilizing a dense PTFE membrane without primary closure: a report of 3 cases. *J Oral Implantol*

2013;39(3):355-61.

Warrer K, Karring T, Nyman S, Gogolewski S. Guided tissue regeneration using biodegradable membranes of polylactic acid or polyurethane. *J Clin Periodontol.* 1992;19:633-640.

8. ANEXOS

Anexo A – Carta de aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia/PUCRS.

Anexo B – Carta Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) PUCRS.

Anexo C – Carta de submissão do Artigo de Pesquisa 1 ao periódico *Clinical Oral Implants Research*



*Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

Porto Alegre 27 de Abril de 2011

O Projeto de: Dissertação

Protocolado sob n°: 0033/11

Intitulado: Avaliação histológica e histomorfométrica da regeneração óssea guiada sob membranas biológicas não reabsorvíveis em ratas osteoporóticas com e sem tratamento com ácido zoledrônico

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. José Antonio Poli de Figueiredo

Pesquisadores Associados Juliano Busetti; Luis André Mezzomo; Maria Antonia Zancanaro de Figueiredo; Nikolaos Donos; Nikolaos Mardas

Nível: Dissertação / Mestrado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 27 de Abril de 2011.

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEUA/PUCRS

Prof. Dra. Ana Maria Spohr
Presidente da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

Av. Ipiranga, 6681, Prédio 06 sala 210
Porto Alegre /RS – Brasil – Cx. Postal:1429
90619-900

Fone/Fax: (51) 3320-3538
e-mail: odontologia-pg@pucrs.br



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 125/11 – CEUA

Porto Alegre, 22 de setembro de 2011.

Senhor Pesquisador:

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 11/00236 intitulado: **“Avaliação histológica e histomorfométrica da regeneração óssea guiada sob membranas biológicas não reabsorvíveis em ratas osteoporóticas com e sem tratamento com ácido zoledrônico”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,


Profa. Dra. Anamaria Gonçalves Feijó
Coordenadora da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. José Antônio Poli de Figueiredo
FO
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314
CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br

**Guided bone regeneration in osteoporotic conditions
following treatment with zoledronic acid**

Journal:	<i>Clinical Oral Implants Research</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Research
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Mardas, Nikos; Bart's & The London School of Dentistry, QMUL, Centre for Adult Oral Health Busetti, Juliano; Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Dental School, Periodontology Figueiredo, José Antonio; Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Dental School, Clinical Dentistry Mezzomo, Luis; Federal University of Santa Catarina, Department of Dentistry Scarparo, Roberta; Federal University of Rio Grande do Sul, Dental School, Department of Conservative Dentistry Donos, Nikolaos; UCL Eastman Dental Institute, Periodontology Unit, Clinical Research Department
Keywords:	Animal Experiments, Biomaterials, Guided tissue regeneration, Bone regeneration, Wound healing

SCHOLARONE™
Manuscripts