



**DOUTORADO EM ODONTOLOGIA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM
IMPLANTODONTIA**

PABLO SANTOS DE OLIVEIRA

**ÍNDICE DE OSTEÓCITOS EM OSSO MANDIBULAR
HUMANO DE INDIVÍDUOS SEM E COM
OSTEOPOROSE TRATADOS COM ALENDRONATO:
ESTUDO HISTOLÓGICO CONTROLADO**

Guarulhos

2014

**DOUTORADO EM ODONTOLOGIA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM
IMPLANTODONTIA**

PABLO SANTOS DE OLIVEIRA

**ÍNDICE DE OSTEÓCITOS EM OSSO MANDIBULAR
HUMANO DE INDIVÍDUOS SEM E COM
OSTEOPOROSE TRATADOS COM ALENDRONATO:
ESTUDO HISTOLÓGICO CONTROLADO**

Dissertação apresentada à Universidade
Guarulhos para obtenção do Título de Doutor
em Odontologia Área de Concentração:
Implantodontia

Orientador: Prof. Dr. José Augusto Rodrigues
Co-Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Cassoni

**Guarulhos
2014**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas Fernando Gay da Fonseca

O48i

Oliveira, Pablo Santos de

Índice de osteócitos em osso mandibular humano de indivíduos sem e com osteoporose tratados com alendronato: estudo histológico controlado / Pablo Santos de Oliveira. -- 2014.

45 f.; 31 cm.

Orientador: Prof. Dr. José Augusto Rodrigues

Tese (Doutorado em Odontologia) – Centro de Pós Graduação e Pesquisa, Universidade Guarulhos, Guarulhos, SP, 2014.

1. Implantes dentários 2. Doenças ósseas metabólicas 3. Alendronato I. Título II. Rodrigues, José Augusto, (Orientador). III. Universidade Guarulhos.

CDD. 617.6



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, intitulada "ÍNDICE DE OSTEÓCITOS EM OSSO MANDIBULAR HUMANO DE INDIVÍDUOS COM E SEM OSTEOPOROSE: ESTUDO HISTOLÓGICO CONTROLADO" em sessão pública realizada em 27 de Outubro de 2014 considerou o candidato Pablo Santos de Oliveira aprovado.

COMISSÃO EXAMINADORA:

1. Prof. Dr. José Augusto Rodrigues (UnG)

2. Prof. Dr. Nilton De Bortoli Junior (FFO-USP)

3. Profa. Dra. Juliana Cama Ramacciato (SLMandic)

4. Prof. Dr. Jamil Awad Shibli (UnG)

5. Profa. Dra. Gabriela Giro Araujo (UnG)

Guarulhos, 27 de Outubro de 2014.

DEDICATÓRIA

A Deus, que sempre me acompanha em cada momento da minha vida.

Dedico esta conquista aos meus pais. A minha grandiosa mãe Rosa Maria, sempre maravilhosa, uma mulher admirável. Minha gratidão, amor, e respeito eternos. Ao meu pai Pedro, pelo grande vínculo de amizade e amor. A eles dedico muito mais que somente este trabalho, dedico tudo o que conquisei e que conquistarei em meu futuro.

A minha irmã Patrícia, sempre disposta em ajudar, e que me presenteou com uma preciosidade de criança que é minha sobrinha Maria.

A minha noiva Isabela, sempre paciente nos momentos da minha ausência, e que se empenhou em me visitar na Itália para me dar apoio. Meu muito obrigado pela compreensão, companheirismo, e por me fazer viver em constante felicidade. Tenha certeza de meu amor e gratidão sinceros.

E a estimada tia Maria Verônica, pelo apoio e motivação ofertados com seu jeito especial de ser.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao orientador Prof. Dr. José Augusto Rodrigues meus sinceros agradecimentos. Muito obrigado pelo profissionalismo, pela sincera amizade e pela total disponibilidade que sempre revelou para comigo, sendo muito mais que um orientador, uma prova de que conhecimento científico e humildade moral devem crescer sempre proporcionalmente.

AGRADECIMENTOS

À Reitoria e a Pró-Reitoria do centro de Pós Graduação e pesquisa da Universidade Guarulhos na pessoa da Profa. Dra. Luciane Lúcio Pereira e à Coordenação do Curso de Doutorado em Odontologia na pessoa da Prof. Dra. Magda Feres.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior - PDSE, processo número 99999.012539/2013-09, que possibilitou o desenvolvimento de parte do meu Doutorado na Itália. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP # 2008 / 06972-6), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq # 579157 / 2008-3, 302768 / 2009-2, 473282 / 2007-0) e à Universidade Guarulhos, pelos apoios concedidos ao Professor Jamil W. Shibli.

À Universidade G. d'Annunzio Chieti e Pescara na pessoa do diretor do departamento de odontologia Prof. Dr. Sergio Caputi, por ter me proporcionado condições necessárias para a elaboração da minha Tese e permitir a minha integração num centro de investigação de tão elevada qualidade e exigência.

Ao estimado co-orientador Prof. Dr. Jamil Awad Shibli, pela dedicação e conhecimentos que foram passados durante o curso e pela confiança depositada em mim quando me ofereceu a oportunidade de realizar parte de meus estudos de Doutorado na Itália.

À co-orientadora Profa. Dra. Alessandra Cassoni pela sua disponibilidade nos trabalhos desenvolvidos durante o curso e pelo seu incentivo e apoio durante o doutorado.

As colegas Dr^a Kelly Christine Dias de Souza Aguiar e Dr^a Tatiana Onuma pela preciosa ajuda no desenvolvimento deste projeto. Sem a ajuda destas profissionais este trabalho não seria possível.

Aos meus queridos amigos, Roberto Amaral, Pedro Henrique Cabral, Ronaldo Viotti, Felipe Brilhante, Eduardo Oliveira, Osvaldo Brasil, Fernanda Sampaio Ramiro, Welington Ferreira de Moraes, André Campos, Rafael de Oliveira Dias e Cleverton

Corrêa Rabelo que estiveram presentes em grande parte do tempo desta conquista. Muito obrigado por terem compartilhado comigo este momento especial. Foi bom poder contar com vocês.

Aos professores, discentes e funcionários da Universidade Guarulhos, pela acolhida e convivência nestes anos de curso.

Ao Prof. Dr. Adriano Piattelli, Dra. Giovanna Iezzi, Dra. Vittoria Perroti, Stefania Lepore e Marcello Piccirilli pela fundamental ajuda na confecção das lâminas histológicas utilizadas nas análises deste trabalho.

Aos Amigos italianos, Flavia Iaculli, Margherita Tumedei, Felice Lorusso, Vincenzo Zizzari, Gianmaria D'addazio, Matteo Marrocco, Salvatore Marra e Piersaint por todo o carinho e hospitalidade com que me acolheram durante a minha estada em Chieti/IT.

Aos pacientes do meu consultório por entenderem a minha ausência e a minha assistente Ângela pelo excelente trabalho desempenhado desde quando se efetivou no cargo.

E por último agradeço a todos os outros familiares e amigos sinceros e verdadeiros que eu conquistei nessa trajetória, mas infelizmente muitos estão distantes, seguindo seu caminho e cumprindo a sua missão, mas sei que mesmo sem contato direto com eles, eu deixei minha marca no coração de cada um, assim como aconteceu comigo. Obrigado a todas as pessoas que participaram deste projeto.

Ninguém vence sozinho...

OBRIGADO A TODOS!

*“A mente que se abre a uma nova ideia,
jamais volta ao seu tamanho inicial”*

ALBERT EINSTEIN

RESUMO

Os osteócitos tem emergido como a principal chave reguladora da homeostase do esqueleto. O número destas células poderia ser influenciado pela presença de osteoporose e osteopenia. Por isto, o objetivo deste estudo foi avaliar a densidade osteocitária em pacientes com osteoporose em tratamento com alendronato e pacientes com osteopenia. Trinta e nove pacientes foram selecionados para este estudo e divididos em 3 grupos: (A) 9 pacientes saudáveis (controle), (B) 15 pacientes com osteopenia, (C) 15 pacientes com osteoporose. Durante a cirurgia de instalação dos implantes na mandíbula, amostras de osso foram removidas por meio de uma trefina e fixados em formol a 10%. Depois disto, os fragmentos foram desidratados em álcool e fixados em resina para preparação das secções. Estas secções foram coradas com fucsina básica e azul de toluidina para realizar as análises histológicas de densidade óssea, mensurada como número de osteócitos por área de tecido ósseo (μm^2). Os dados foram avaliados por meio do teste de Kruskal-Wallis. Pacientes com osteopenia mostraram valores estatisticamente maiores de densidade de osteócitos que pacientes com osteoporose. Não foram observadas diferenças estatísticas entre pacientes com osteopenia e osteoporose versus pacientes saudáveis. Foi observado que as doenças do metabolismo ósseo em estudo (osteoporose e osteopenia) não influenciam a densidade osteocitária.

Palavras Chaves: Implantes dentários, Osteopenia, Osteoporose, Densidade osteocitária, Bifosfonato, Alendronato.

ABSTRACT

Osteocytes have emerged as key regulators of skeletal and mineral homeostasis. The number of these cells could be influenced by the presence of osteoporosis and osteopenia. Hence, the aim this study was to evaluate the osteocyte density in patients with osteoporosis in treatment with alendronate and patients with osteopenia. Thirty-nine patients were selected for this study and divided into 3 groups: (A) 9 healthy patients (control), (B) 15 patients with osteopenia, (C) 15 patients with osteoporosis. During the surgical insertion of dental implants in the lower jaw, bone samples were retrieved using a trephine bur and inserted in packed in 10% buffered formalin. After this, the fragments were dehydrated in formalin and fixed in resin for the preparation of the sections. These sections were stained with basic fuchsin and toluidine blue and evaluated for counting of osteocytes/ μm^2 for histological analysis of osteocyte density, measured as number of osteocytes/bone tissue area (μm^2). The data were evaluated by means of Kruskal-Wallis test. Patients with osteopenia showed statistically higher values of osteocyte density than patients with osteoporosis. No significant differences were detected between osteopenia and osteoporosis subjects vs healthy patients. It was observed that the bone metabolism diseases (osteoporosis and osteopenia), do not influence the osteocyte density.

Key-Words: Dental Implants, Osteopenia, Osteoporosis, Osteocyte density, Bisphosphonate, Alendronate.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	8
2. PROPOSIÇÃO.....	15
3. ARTIGO - submetido E ACEITO PELA revista Clinical Oral Implants Research	16
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
5. REFERÊNCIAS	31
6. ANEXOS.....	39
6.1. COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO ARTIGO PELA REVISTA	39
6.2. COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	40

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Em condições normais o osso sofre um processo contínuo de remodelação para se adaptar à demanda do organismo por meio de um delicado equilíbrio entre reabsorção e formação que é realizado pelos osteoclastos e osteoblastos, respectivamente (Hesse et al., 2014). Entretanto com o avançar da idade o processo de reabsorção torna-se aumentado (Rodan e Martin, 2000). A Osteopenia e osteoporose são doenças que resultam de um nível de remodelação óssea desequilibrada (Harris et al., 1969), isto pode resultar na diminuição da densidade mineral e na alteração da microarquitetura óssea, tornando o osso mais susceptível à fraturas (Rachner et al., 2011).

A osteopenia é uma diminuição de massa óssea causada pela perda de cálcio, podendo ter, como consequência, a osteoporose. Contudo, o termo osteopenia nem sempre está associado a doença uma vez que pode haver indivíduos que naturalmente apresentam baixa densidade óssea (Karaguzel et al., 2010).

A osteoporose é uma doença metabólica em que a quantidade de osso reabsorvido é maior que a de osso formado. Isto provoca um declínio constante no volume e qualidade óssea (Riggs et al, 2005). A osteoporose pode ser classificada como primária ou secundária. Osteoporose primária pode afetar ambos os sexos em todas as idades (Mullender et al., 2005). Ocorre com mais frequência em mulheres após a menopausa ou homens em idades avançadas. Osteoporose secundária é resultada do uso de medicações, ou de outras condições e doenças (NIH Consensus Statement, 2000). A causa mais comum do desenvolvimento da osteoporose secundária inclui o tratamento a longo prazo com terapia de glicocorticóide para artrites inflamatórias (como artrite reumatóide), hipogonadismo em homens, síndromes de má-absorção e hiperparatireoidismo primário (Polymeris et al., 2013).

A osteoporose é uma doença emergente caracterizada por uma deficiência de massa óssea, e alteração da microarquitetura do tecido ósseo, o que aumenta a propensão de fraturas por fragilidade (NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention Diagnosis, and Therapy, 2001). A densidade mineral óssea (DMO) pode ser avaliada pelo exame de absorciometria por duplo feixe de raios-x

(DXA) que pode constatar se um paciente apresenta a osteoporose (Rachner et al, 2011).

Cerca de 40% das mulheres caucasianas na pós-menopausa são afetadas pela osteoporose, e com o envelhecimento da população este número deverá aumentar de forma constante nos próximos anos (Melton et. Al, 1992). O risco de fratura em um paciente com osteoporose é aumentada em 40%, e a maioria das fraturas ocorre na coluna vertebral, quadril ou pulso (Rachner et al, 2011). Além disto, outros ossos, tais como o úmero ou costelas podem também estar envolvidos (Center et. Al, 1999).

Uma fratura, e a conseqüente perda de mobilidade e autonomia representam uma grande queda na qualidade de vida (Burge et. Al, 2007). Com isto, as fraturas osteoporóticas de quadril e coluna vertebral representam uma taxa de mortalidade superior a 20% em até 12 meses após a fratura, uma vez que necessitam de hospitalização e, posteriormente, aumentam o risco de desenvolvimento de outras complicações médicas, como pneumonia ou doença tromboembólica devido a imobilização crônica (Center et. Al, 1999).

Como a perda óssea ocorre de forma insidiosa e é inicialmente um processo assintomático, a osteoporose é frequentemente diagnosticada apenas após a primeira fratura clínica ocorrer, conseqüentemente, a terapia é muitas vezes destinada a prevenir novas fraturas (Vestergaard et al, 2005). Por isso, é importante avaliar o risco de osteoporose no indivíduo com antecedência suficiente para evitar a primeira fratura (Rachner et al, 2011). Diretrizes nacionais e internacionais foram implementadas para lidar com a questão do rastreio de osteoporose baseada em evidências (Compston et. al, 2009). Vários fatores de risco, tais como idade, índice de massa corpórea, fraturas por fragilidade, história familiar de fraturas, o uso de glicocorticóides e tabagismo ativo deve ser levado em consideração (Kanis, 2002).

A densidade óssea mineral é considerada um fator de risco que deve ser avaliada no contexto de idade, sexo, tabagismo, peso, história familiar e/ou fratura (Cummings et. al, 2002). Os fatores de risco mais frequentes para a osteoporose são: alto risco - Idade acima de 65 anos, deficiência de estrogênio, menopausa precoce fisiológica ou cirúrgica (<45 anos), fratura osteoporótica precoce, tratamento com corticosteróides, doenças endócrinas: hipertireoidismo, Hiperparatireoidismo, hipogonadismo masculino, fratura osteoporótica e baixo peso ao nascer. Risco moderado: - Menopausa fisiológica, baixa ingestão de cálcio, fumantes, alcoolismo,

Doenças osteopênicas: gastrointestinal (deficiência de absorção intestinal, ressecção intestinal, doença intestinal inflamatória, gastrectomia), doença hepática crônica, transplante, artrite reumatóide, insuficiência renal crônica, doença pulmonar obstrutiva crônica, diabetes mellitus. Drogas: Lítio, heparina, imunossupressores, medicamentos quimioterápicos e etc (Mellado-Valero et. al, 2010).

Assim, a decisão de tratar ou não o paciente irá basear-se não só no resultado da densidade mas também nos fatores de risco (NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention Diagnosis, and Therapy, 2001). Por um lado, usa-se o termo osteoporose primária para as situações em que a diminuição da massa óssea, pode ser explicada por alterações involutivas de envelhecimento, assim como as alterações hormonais da menopausa. Por outro lado, usa-se o conceito de osteoporose secundária para a causada ou enfatizada por outras doenças ou medicamentos (Stein et. al, 2002).

Existem diferentes tratamentos para a osteoporose, todos destinados a reduzir o risco de fraturas. Assim, o estrógeno é utilizado no tratamento em mulheres na pós-menopausa. Moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (especialmente raloxifeno), calcitonina, uma forma recombinante de paratormônio (teriparatida), ranelato de estrôncio e, especialmente, bifosfonados, são drogas amplamente utilizadas na prática clínica (Laroche, 2008) .

A mensuração da densidade mineral óssea é realizada pelo exame de absorciometria por duplo feixe de raios-x (DXA - *dual energy X-ray absorptiometry*) que é considerado o método mais adequado para o diagnóstico de alterações ósseas (como osteoporose e osteopenia) devido a sua alta precisão, e consequentemente pode ajudar na avaliação do risco de fratura óssea, uma vez que mostra o grau de densidade óssea, ou seja, quanto menor a densidade maior será o risco de acontecer uma fratura (Kim et al., 2014). Então, uma solução ideal, em termos de praticidade, custos e riscos, seria a adaptação de imagens com base no DXA. As imagens proporcionadas por este aparelho podem ser usadas para identificar fraturas vertebrais existentes (Bonnick, 2009), avaliar a geometria das costelas e para estimar a resistência femoral (Langton et. al, 2009). Além disso, uma medida que considera a distribuição mineral óssea no fêmur proximal, em vez de medir apenas a densidade óssea mineral, pode ser bem adequada para melhorar a avaliação de risco de fratura do quadril (Boehm et. al, 2007). Com isto, é realizada a avaliação da densidade óssea com uma unidade de medida chamada T-score. Por

meio desta, é possível avaliar se um paciente é osteopênico ($-1 < T\text{-score} \leq -2.5$), osteoporótico ($T\text{-score} \leq -2.5$) ou saudável ($T\text{-score} \geq -1$) (Hanson, 1997; Looker et al. 1998; World Health Organ Tech Rep Ser., 1994).

Os meios de prevenção da osteoporose incluem o uso adequado de cálcio e vitamina D, atividade física, terapia hormonal de substituição, moduladores seletivos de receptor de estrógeno, e bifosfonados (Dervis, 2005). Fleisch et al. (1968) foi um dos primeiros autores a citar o bifosfonado como uma alternativa às terapias de substituição de hormônios na osteoporose. Tem sido mostrado que este fármaco reduz significativamente o risco de fratura (Lieberman et al., 1995; Dillon et al., 2008).

Os bifosfonados, análogos não metabolizados de pirofosfato, são um grupo de fármacos que inibem a reabsorção óssea (Lieberman et al., 1995; Dillon et al., 2008). Eles agem sobre os osteoclastos, por meio da inibição e indução à apoptose (Dillon et al., 2008). Há importantes diferenças entre bifosfonados administrados por via intravenosa e aqueles tomados por via oral (Otomo-Corgel, 2012). Os bifosfonados intravenosos são utilizados para reduzir a dor óssea, hipercalcemia maligna, complicações ósseas sofridas por pacientes com doença de Paget ou mieloma e para o tratamento de metástase óssea derivada a partir de vários cânceres. Já o bifosfonado oral é utilizado para o tratamento da osteoporose, doença de Paget e da osteogênese imperfeita (Wang et al., 2007).

Um estudo realizado por Estilo et al. (2008) demonstrou que a duração da terapia com bifosfonados e um fator significativo que aumenta a probabilidade do aparecimento da osteonecrose. Esta condição se refere a exposição de osso na mandíbula ou maxila persistindo por mais de 8 semanas em pacientes que já fizeram ou que fazem uso de bifosfonados e que não apresentaram história de terapia com radiação na região mandibular (Migliorati et al., 2005).

A associação entre o uso de bifosfonados e o desenvolvimento da osteonecrose não é necessariamente causalidade. As generalizações sobre esta relação complexa não podem ser feitas na base de um único relato (Wang et al., 2007). Em pacientes submetidos ao tratamento intravenoso, há o aumento do risco de falha do implante e, provavelmente, a inserção do mesmo deve ser evitada (Wang et al., 2007).

Na última década, a patogênese da osteoporose tem sido ligada as reações teciduais, em níveis moleculares e celulares. Sinais que atuam como mediadores entre as células foram definidos como uma integração de vários estímulos mecânicos, endócrinos, neuroendócrinos e inflamatórios. A nível celular, a comunicação e o acoplamento entre os principais tipos de células de osso, os osteoblastos (responsável pela formação óssea) e os osteoclastos (responsáveis pela reabsorção óssea) constituem a menor unidade funcional do tecido ósseo. Várias moléculas conduzem e coordenam as atividades de osteoblastos e osteoclastos durante a remodelação óssea. O conhecimento detalhado das atividades moleculares e celulares criou um novo conceito de fisiopatologia óssea com alguns desses novos princípios encontrando seu caminho para a prática clínica (Rachner et al, 2011).

As atividades realizadas pelos osteoclastos e osteoblastos são orquestradas pelos osteócitos, estes são os tipos de células mais abundantes do tecido ósseo e que são responsáveis pela formação da rede de matriz mineralizada (Bonewald, 2011), que é importante para a comunicação e o transporte de nutrientes entre as células ósseas (Busse et al., 2010). Além disto, existe um consenso de que os osteócitos desempenham um papel importante na tradução de estímulos mecânicos em sinais bioquímicos (Knothe Tate et al., 2004). Por isto, os osteócitos são considerados células ósseas mecanosensitivas responsáveis por ativar outras células ósseas para iniciar a atividade de remodelação em resposta a estímulos mecânicos (Cowin et al., 1991; Lanyon, 1993; Aarden et al., 1996; Knothe Tate et al., 2004), desempenhando assim, um papel chave na regulação da remodelação óssea (Mullender et al, 1995; Bakker et al., 2004). As células ósseas de pacientes com osteoporose são debilitadas em sua resposta ao estresse mecânico, o que sugere que os sinais mecânicos são escassos na osteoporose (Sterck et al., 1998), levando a perda de massa óssea, como também ocorre em condições de falta de estímulo (Rodan, 1991). Isto tem como consequência a presença de qualidade óssea reduzida neste tipo de paciente (Parfitt, 1984; Kleerekoper et al. 1985).

A substituição de osso com microlesões, por exemplo, parece ocorrer em locais de apoptose de osteócitos, provavelmente relacionada a atenuação de sinais inibitórios enviados por estas células (Qiu et al., 2002). Além disto, as alterações no ambiente osteocitário resulta na liberação de fatores de crescimento e citocinas que

afetam os osteoblastos e osteoclastos (Vashishth et al., 2002). Por meio disto, é possível sugerir que o número de osteócitos ou a densidade de osteócitos está diretamente relacionada com a remodelação óssea (Barros et al., 2009).

Os receptores de estrógeno são abundantemente expressados em osteócitos (Batra et al. 2003). Esta expressão é menor nas células da linhagem dos osteoblastos. Isto indica que os osteócitos estão envolvidos na remodelação óssea mediada por estrógeno e pode ser uma explicação para a maior perda óssea em mulheres no período de pós-menopausa (Mullender et al., 2005). A densidade de osteócitos é considerada um importante fator para verificar o resultado do processo de remodelação óssea, uma vez que é observada diferenças de densidade de osteócitos entre indivíduos saudáveis, com osteopenia e osteoporose (Qiu et al., 2003; Hernandez et al., 2004). No osso trabecular da crista ilíaca, a densidade de osteócitos diminui com o aumento da idade e é diferente entre indivíduos saudáveis e com osteoporose (Qui et al., 2003; Mullender et al., 1996).

A deficiência de osteócitos pode contribuir para a fragilidade óssea, seja pela maior presença microlesões ósseas ou por reduzir o fluxo canalicular (Qui et al., 2003; Burger et al., 2003). O número de osteócitos reflete o número de osteoblastos incorporados na matriz óssea uma vez que os osteoblastos são precursores de osteócitos (Parfitt, 1993; Dunstan et al., 1993). Assim os osteócitos representam a fase final de diferenciação dos osteoblastos. Esta diferenciação envolve uma reestruturação intracelular e do citoesqueleto destas células (Kalajzic et al, 2013). Uma redução no número de osteócitos no osso osteoporótico pode, portanto, estar relacionada com um decréscimo do número de osteoblastos disponíveis para incorporação na matriz. Tem sido sugerido que o recrutamento deficitário de osteoblastos e o decréscimo da maturação de pré-osteoblastos em osteoblastos são fatores que contribuem para a perda óssea relacionada a idade e à presença de osteoporose (Roholl et al., 1994; Parfitt et al., 1995;).

O estudo sobre osteócitos alcançou o campo da odontologia, sobretudo a implantodontia, concentrando-se principalmente no processo de osseointegração (Barros et al., 2009; Haga et al., 2011). O tecido ósseo deve satisfazer os determinantes físicos de força de todo o osso e para que isto aconteça o fator densidade óssea tem grande importância. Em outras palavras, o osso de suporte de carga em torno de implantes dentários deve ser mecanicamente e biologicamente

competente (Traini et al., 2013). Assim, o aumento do conhecimento da densidade de osteócitos pode contribuir para uma melhor compreensão da biologia óssea e como consequência facilitar a avaliação e tratamento tanto médico como odontológico de pacientes com osteoporose.

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo prospectivo, histológico e histométrico controlado foi avaliar a densidade de osteócitos no osso mandibular em pacientes com osteoporose em tratamento com alendronato e pacientes com osteopenia.

3. ARTIGO - SUBMETIDO E ACEITO PELA REVISTA CLINICAL ORAL IMPLANTS RESEARCH

OSTEOCYTE DENSITY IN OSTEOPENIC PATIENTS, AND IN PATIENTS WITH OSTEOPOROSIS TREATED WITH BISPHOSPHONATES. A CONTROLLED HISTOLOGICAL HUMAN STUDY

Pablo S. Oliveira*, José Augusto Rodrigues*, Jamil Awad Shibli*, Adriano Piattelli**,
Giovanna Iezzi**, Vittoria Perrotti**.

* Department of Periodontology and Oral Implantology, Dental Research Division,
Guarulhos University, Guarulhos, SP, Brazil.

** Department of Medical, Oral and Biotechnological Sciences, University of Chieti–
Pescara, Chieti, Italy.

Running title: osteocyte density in osteopenic and osteoporosis patients

Abstract word count: 185.

This article contains 27 references, 2 figures and 1 table.

Corresponding Author

Prof. Jamil A. Shibli

Praça Tereza Cristina, 01 - 07023-070 - Guarulhos, SP – Brazil

e-mail: jashibli@yahoo.com

Tel. +55 11 2441-3670 / Fax: +55 11 24641758

ABSTRACT

Objectives: Osteocytes have emerged as key regulators of skeletal and mineral homeostasis. The number of these cells could be influenced by the presence of osteoporosis and osteopenia. Hence, the aim this study was to evaluate the osteocyte density in osteopenic patients, and in patients with osteoporosis treated with bisphosphonates.

Materials and Methods: Thirty-nine patients were selected for this study and divided into 3 groups: (A) 9 healthy patients (control), (B) 15 patients with osteopenia, (C) 15 patients with osteoporosis. During the surgical insertion of dental implants in the lower jaw, bone samples were retrieved and processed for histological analysis of osteocyte density, measured as number of osteocytes/bone tissue area (μm^2).

Results: Patients with osteopenia showed statistically higher values of osteocyte density than patients with osteoporosis ($p < 0.05$) No significant differences were detected between osteopenia and osteoporosis subjects vs healthy patients ($p > 0.05$).

Conclusions: Bone metabolism diseases (osteoporosis and osteopenia), do not seem to influence the osteocyte density; this could be due to the administration of bisphosphonates in osteoporotic patients. These informations could play a fundamental role in the diagnosis and treatment of patients in a postmenopausal stage.

Key-Words: Dental Implants, Osteopenia, Osteoporosis, Osteocyte density.

INTRODUCTION

Postmenopausal osteoporosis is a metabolic disease where a negative balance of bone turnover causes a steady decline of bone volume and quality (Riggs & Parfitt 2005), producing a 25% decrease of the total bone tissue (Consensus Development Conference on Osteoporosis 1993); as a consequence of the compromised integrity of the skeleton it predisposes to an increased risk of fractures. Osteopenia is considered a precursor of osteoporosis; this condition is characterized by a physiological decrease of bone mineral density between 10 and 25% from the physiological state (Consensus Development Conference on Osteoporosis 1993). Osteoporosis and osteopenia, induced in experimental animal model, before, after or simultaneously with dental implant placement, alter the process of osseointegration and produce a significant reduction in the bone-to-implant contact (Mellado-Valero et al. 2010). However, previous histological evaluation on retrieved dental implants from human jaws from subjects with and without osteoporosis, demonstrated that, this metabolic diseases did not alter the osseointegration rates, at least after the initial healing period (Shibli et al. 2008).

Bone tissue is characterized by a constant turnover in response to mechanical stimuli, such as loading, and osteocytes seem to play an essential role in bone mechanical adaptation to loading. The osteocyte network is also regarded as the main mechano-sensor mechanism of bone tissue (Price et al. 2011, You et al. 2000). Osteocyte density is the result of bone remodeling process (Qui et al. 2003, Hernandez et al. 2004), and it shows differences between healthy and osteoporotic subjects. In healthy women, there is a significant inverse relationship between osteocyte density in superficial bone and bone formation rate (Qiu et al. 2002). Therefore, an alteration of osteocytes number or function could affect bone healing, remodelling and turnover, which are on turn regulated by osteoblasts, osteoclasts and, last but not least, osteocytes.

Bisphosphonates (BPs) are non-metabolized analogues of pyrophosphate drugs, widely used as bone-stabilizers in the treatment of osseous metastases, osteoporosis and Paget's disease due to their ability to inhibit osteoclast activity (Abuid et al. 2008). These medicaments have been shown to significantly reduce the risk of bone fracture (Dhillon & Lyseng-Williamson 2008). However, some studies suggested that high doses of BPs were directly cytotoxic to osteocytes and produce

cell death and necrosis (Allen & Burr 2008).

The aim of the present prospective, controlled histological and histomorphometrical study was to evaluate the osteocyte density (number of osteocytes/bone tissue area $-\mu\text{m}^2$) in healthy and osteopenic patients, and in patients with osteoporosis treated with bisphosphonates.

MATERIALS AND METHODS

Study design

A total of 45 post-menopausal women (mean age of 61.6 ± 5.97 years) from 435 patients were included in the present prospective study. The patients were referred at Oral Implantology Clinic, Guarulhos University, Guarulhos, SP, Brazil and performed the DXA test (Dual energy X- ray absorptiometry), in order to evaluate their bone density as function of T-score index (World Health Organization, Switzerland, 1994). The patients were submitted to anamnesis (medical and dental history), intra-oral clinical examination and preoperative laboratory tests, including complete blood count, coagulation profile, blood glucose, serum calcium and creatinine.

The inclusion criteria were: postmenopausal period; total edentulism in the mandible; at least 10mm of residual bone height and 5mm bone thickness for the implant installation determined after clinical examination using a thickness gauge, and osteoporotic patients in oral treatment with alendronate sodium MSD 70 mg (Fosamax, Merck Sharp & Dohme Pharmaceuticals Ltd. Campinas, SP). Exclusion criteria were: vascular diseases; chronic diseases such as rheumatoid arthritis and diabetes; smoking; chronic alcoholism; moderate or advanced chronic periodontal disease; diseases of the oral mucosa; use of glucocorticosteroids or other immunosuppressive drugs; history of radiotherapy in the head and neck region; insufficient availability of bone tissue to permit insertion of dental implants.

The subjects were divided according their DXA test results into 3 groups: (A) control group, including 15 healthy patients (T -score ≥ -1); (B) test group 1, including 15 patients with osteopenia (T -score -1 to -2.5); test group 2, including 15 patients with osteoporosis in treatment with alendronate for at least 1 year (T -score ≤ -2.5) (Hanson 1997; Looker et al. 1998). The protocol was approved by the Ethics

Committee in Research of Guarulhos University, SP, Brasil (protocol #147/2007), following the World Medical Association Declaration of Helsinki requirements and all the subjects signed a written informed consent form.

Surgical phase

Implant placement was performed only in the mandible. Briefly, after local anaesthesia, a full flap was elevated and implants were inserted. Bone cores were retrieved using a trephine bur (internal wide 2.0 mm) under copious irrigation, prior to the implants insertion.

Histological processing

All the specimens were washed in saline solution and immediately fixed in 10% buffered formalin. The specimens were processed to obtain thin ground sections with the Precise 1 Automated System (Assing, Rome, Italy). They were dehydrated in an ascending series of alcohol rinses and embedded in a glycolmethacrylate resin (Technovit 7200 VLC, Kulzer, Wehrheim, Germany). After polymerization the specimens were sectioned, along their longitudinal axis, with a high-precision diamond disk at about 150 μm and ground down to about 30 μm with a specially designed grinding machine Exakt, System (EXAKT, Apparetebau GmbH, Germany). One slide was obtained for each specimen. The slides were stained with acid fuchsin and toluidine blue (Piatelli et al. 1996). Histomorphometry was carried out using a transmitted light microscope (Laborlux S, Leitz, Wetzlar, Germany) connected to a high-resolution video camera (3CCD, JVC KY-F55B, JVC®, Yokohama, Japan) and interfaced to a monitor and PC (Intel Pentium III 1200 MMX, Intel®, Santa Clara, CA, USA). This optical system was associated with a digitizing pad (Matrix Vision GmbH, Oppenweiler, Germany) and a histometry software package with image capturing capabilities (Image-Pro Plus 4.5, Media Cybernetics Inc., Immagini & Computer Snc Milano, Italy). Histomorphometric measurements (Piatelli et al. 2014, Barros et al. 2010, Shibli et al. 2010) were conducted at 200x; osteocytes density was obtained using the ratio of the osteocyt number, counted manually for each specimen in 10 different fields, to the bone tissue area (μm^2), with the above-mentioned software package (Fig. 1).

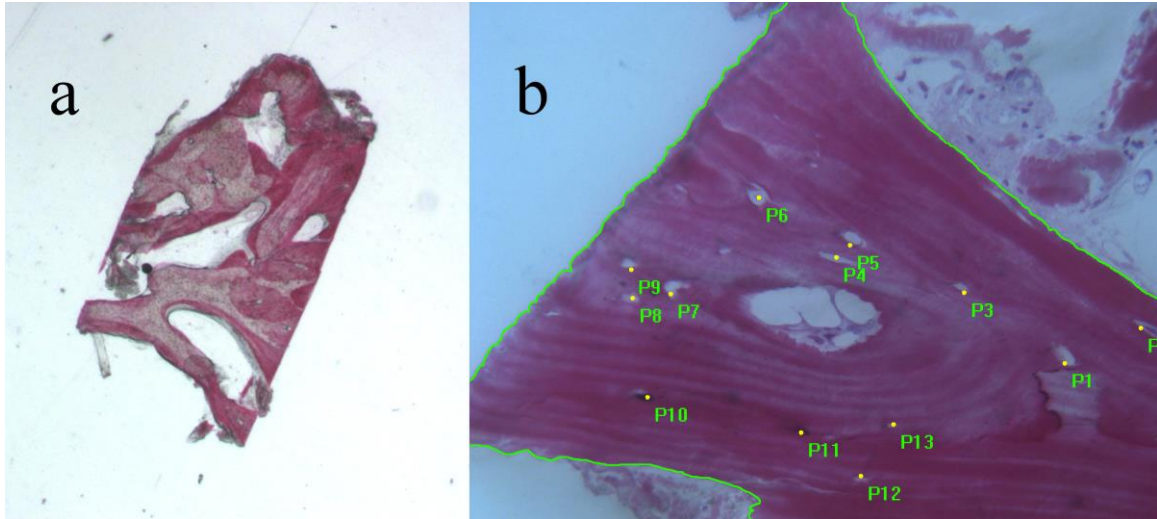


Fig. 1. To determine the osteocyte density, the bone area was delineated (green line), and the osteocytes (yellow points) were counted at 200x magnification in slides stained with acid fuchsin and toluidine blue. a) Full sample at 40x magnification of; b) Sample analyzed at 200x magnification.

Statistical analysis

The data were evaluated by means of Kruskal-Wallis test (Kruskal & Wallis 1952); differences among groups were assessed by Dunn's Multiple Comparisons Test (Dunn 1961). Statistical significance was set to $p < 0.05$. All the data are presented as means + / - standard deviation (SD).

RESULTS

A total of 45 bone samples were taken: 15 samples from control group; 15 samples from osteopenia group and 15 samples from osteoporosis group. Six out of 15 samples from control group were not processed for ground section due to insufficient amount of bone. Therefore, 39 bone samples were evaluated for osteocyte index.

Table 1 shows the osteocyte density of the evaluated groups. The highest osteocyte density value was observed in patients with osteopenia ($p < 0.05$; Group B), followed by healthy and osteoporotic subjects (groups A and C respectively). No significant differences were detected between osteopenia and osteoporosis group vs control patients ($p > 0.05$).

Fig. 2. Osteocyte density for the 3 different groups presented as mean \pm standard deviation.

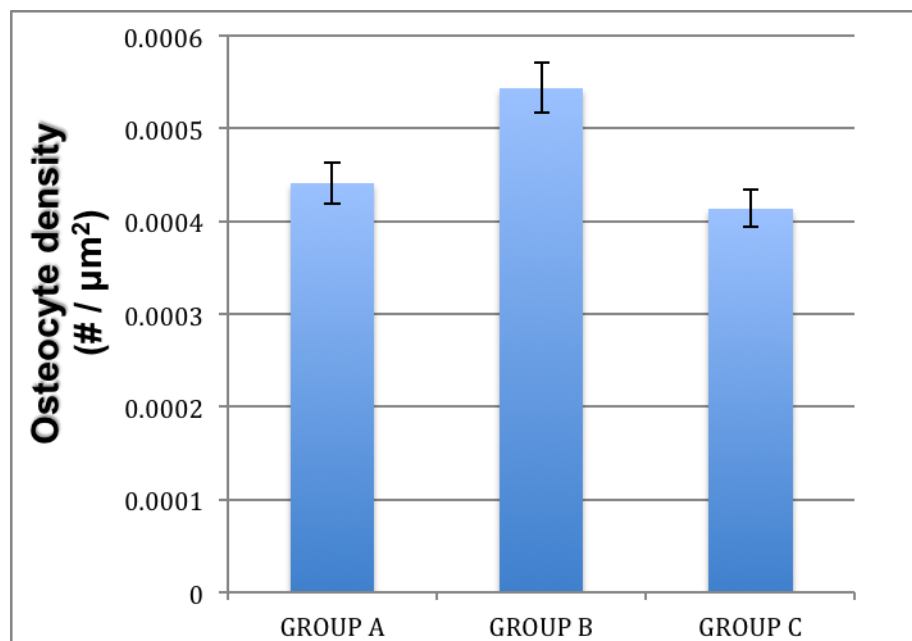


Table. 1. Comparison of osteocyte density among the study groups - Kruskal-Wallis test followed by Dunn's Multiple Comparisons Test ($p < 0.005$).

Groups	Control (<i>n</i> =9)	Osteopenia* (<i>n</i> =15)	Osteoporosis (<i>n</i> =15)
Mean	0.004367	0.005387	0.004047
SD	0.00049	0.001273	0.00184
Range	0.0038 – 0.0051	0.0035 – 0.0076	0.0010 – 0.0084

GROUP A – Control; GROUP B – Osteopenia; GROUP C - Osteoporosis

*Statistic significant; Osteopenia > Control=Osteoporosis

DISCUSSION

The results of the present study showed no differences in terms of osteocyte density in healthy patients when compared to osteoporosis. This fact could be related for osteoporotic patient with the use of bisphosphonates (alendronate), that play a key role in the inhibition of osteoclasts and in the preservation of bone matrix (Dhillon & Lyseng-Williamson 2008; Liberman et al. 1995), while for the patients with osteopenia the number of osteocytes was higher because the bone turnover is increased to compensate for bone loss (Fujiwara et al., 2014), since they did not use alendronates.

Similar results were observed in a ovariectomized rats where both osteocyte lacunar size and osteocyte density were altered in newly-formed bone after antiresorptive and anabolic pharmaceutical treatment (Tommasini et al. 2012). In the other hand, Mullender et al. (2005) compared the osteocyte density from iliac crest bone in four groups of subjects: osteoporotic male, osteoporotic female, control male, and control female. It was observed that the osteocyte density was higher in healthy females than in healthy males and lower in osteoporotic females than in healthy females. These results were not observed in our study, since patients with osteoporosis presented the same osteocyte density than healthy patients, probably

because osteoporotic patients included in the present study had used bisphosphonates, as described before.

Osteocytes were shown to be necessary to maintain bone mass in response to normal load (Bonewald & Johnson 2008), and, probably, their presence could be associated with the ability of bone to efficiently remodel, maintain normal levels of mineralization, and repair accumulated microdamages (Ma et al 2008). A minimum number of osteocytes seemed to be essential for their operational network (Vashishth et al. 2000). The osteocyte canaliculi arrived at the marrow spaces and were able to recruit osteoclast precursors or induce mesenchymal stem cells differentiation (Power et al. 2002). In addition, some studies (Allen & Burr 2008; Huja et al. 2009) suggested that high doses of bisphosphonates were directly cytotoxic to the osteocytes and produced cell death and necrosis. A previous animal study (Huja et al. 2009) evaluated the effects of zoledronic acid, a commonly used bisphosphonate in the treatment of bone metastases, on bone resorption. It was observed that this drug suppressed bone formation without causing osteocyte death. This could explain the high number of osteocytes in patients with osteoporosis observed in our study, without any significant differences when compared to the control group.

Finally, data obtained from retrieved bone cores from human mandibles could represent more authentic information of jawbone than those obtained elsewhere (Mullender et al. 2005). Hence, the present results could be clinically useful in the diagnosis and treatment of postmenopausal jawbone loss and, in addition, in the planning of implant-prostheses rehabilitations in these patients.

CONCLUSION

Bone metabolism diseases (osteoporosis), do not seem to influence the osteocyte density; this may be due to the administration of bisphosphonates in osteoporotic patients. This information could play a fundamental role in the diagnosis and treatment of patients in a postmenopausal stage.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a scholarship to Dr. Oliveira from CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brasília, DF 70.040-020, Brazil (CAPES, process number 99999.012539/2013-09); Prof. Shibli received grants from Sao Paulo Research Foundation (FAPESP # 2008/06972-6), The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq # 579157/2008-3, 302768/2009-2, 473282/2007-0) and Guarulhos University (PesqDOC). The authors declare that there are no conflicts of interest related to this study. The Authors thank doctors Kelly C.D. Aguiar and Alessandra Cassoni for their help in the surgical procedures and study design.

REFERENCES

- Abuid, M.H., Warnke, P.H., Gottschalk, J., Springer, I., Wiltfang, J., Acil, Y., Russo, P.A. & Kreuzsch, T. (2008) "Bis-phossy jaws" – high and low risk factors for bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *Journal of Cranio-maxillofacial Surgery* 36: 95–103.
- Allen, M.R & Burr, D.B. (2008) Mandible matrix necrosis in beagle dogs after 3 years of daily oral bisphosphonate treatment. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 66: 987–994.
- Barros, R.R., Degidi, M., Novaes, A.B., Piattelli, A., Shibli, J.A. & Iezzi, G. (2009) Osteocyte density in the peri-implant bone of immediately loaded and submerged dental implants. *Journal of Periodontology*;80(3):499-504
- Bonewald, L.F. & Johnson, M.L. (2008) Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* 42: 606-615.
- Consensus Development Conference on Osteoporosis. Hong Kong (1993). *The American Journal of Medicine* 95:1S-78S.
- Dhillon, S. & Lyseng-Williamson, K.A. (2008) Zoledronic acid - A review of its use in the management of bone metastases of malignancy. *Drugs* 68: 507–534.

Dunn O.J. (1961) Multiple comparisons among means. *Journal of the American Statistical Association* 56: 52–64.

Fujiwara S, Hamaya E, Sato M, Graham-Clarke P, Flynn JA, Burge R. Systematic review of raloxifene in postmenopausal Japanese women with osteoporosis or low bone mass (osteopenia). *Clin Interv Aging*. 2014 Nov 5;9:1879-1893.

Hanson, J. (1997) Standardization of proximal femur BMD measurements. International Committee for Standards in Bone Measurement. *Osteoporosis International* 7: 500–501.

Hernandez, C.J., Majeska, R.J. & Schaffler, M.B. (2004) Osteocyte density in woven bone. *Bone* 35:1095–1099.

Huja SS, Fernandez SA, Phillips C, Li Y. (2009) Zoledronic acid decreases bone formation without causing osteocyte death in mice. *Archives of Oral Biology* 54: 851-856.

Kruskal, W.H. & Wallis, W.A. (1952) Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47: 583–621.

Looker, A.C., Wahner, H.W., Dunn, W.L., Calvo, M.S., Harris, T.B., Heyse, S.P., Johnston Jr., C.C. & Linasay, R. (1998) Updated data on proximal femur bone mineral levels of US adults. *Osteoporosis International* 8: 468–489.

Ma, Y.L., Dai, R.C., Sheng, Z.F., Jin, Y., Zhang, Y.H., Fang, L.N., Fan, H.J. & Liao, E.Y. (2008) Quantitative associations between osteocyte density and biomechanics, microcrack and microstructure in OVX rats vertebral trabeculae. *Journal of Biomechanics* 41: 1324-1332.

Mellado-Valero, A., Ferrer-García, J.C., Calvo-Catalá, J. & Labaig-Rueda, C. (2010) Implant treatment in patients with osteoporosis. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*. 15: 52-57.

Mullender, M.G., Tan, S.D., Vico, L., Alexandre, C. & Klein-Nulend J. (2005) Differences in osteocyte density and bone histomorphometry between men and

women and between healthy and osteoporotic subjects. *Calcified Tissue International* 77: 291-296.

Piattelli, A., Artese, L., Penitente, E., Iaculli, F., Degidi, M., Mangano, C., Shibli, J.A., Coelho, P.G., Perrotti, V. & Iezzi, G. (2014) Osteocyte density in the peri-implant bone of implants retrieved after different time periods (4 weeks to 27 years). *Journal of Biomedical Materials Research part B: Applied Biomaterials*; 102(2):239-243.

Piattelli, A., Scarano, A. & Quaranta, M. (1997) High-precision, cost-effective cutting system for producing thin sections of oral tissues containing dental implants. *Biomaterials* 18: 577–579.

Power, J., Loveridge, N., Rushton, N., Parker, M. & Reeve, J. (2002) Osteocyte density in aging subjects is enhanced in bone adjacent to remodeling Haversian system. *Bone* 30: 859-865.

Price, C., Zhou, X., Li, W. & Wang, L. (2011) Real-time measurement of solute transport within the lacunar–canalicular system of mechanically loaded bone: Direct evidence for load-induced fluid flow. *Journal of Bone and Mineral Research* 26: 277–285.

Qiu, S., Rao, D.S., Palnitkars, S. & Parfitt, A.M. (2002) Relationships between osteocyte density and bone formation rate in human cancellous bone. *Bone* 31: 709–711.

Qui, S., Rao, D.S., Palnitkar, S. & Parfitt, A.M. (2003) Reduced iliac cancellous osteocyte density in patients with osteoporotic vertebral fracture. *Journal of Bone and Mineral Research* 18: 1657–1663.

Riggs, B.L. & Parfitt, A.M. (2005) Drugs used to treat osteoporosis: the critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling. *Journal of Bone and Mineral Research* 20: 177–184.

Shibli, J.A., Grassi, S., Piattelli, A., Pecora, G.E., Ferrari, D.S., Onuma, T., d'Avila, S., Coelho, P.G., Barros, R. & Iezzi, G. (2010). Histomorphometric evaluation of bioceramic molecular impregnated and dual acid-etched implant surfaces in the human posterior maxilla. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*;12(4):281-288.

Shibli, J.A., Aguiar, K.C., Melo, L., d'Avila, S., Zenóbio, E.G., Faveri, M., Iezzi, G. & Piattelli A. (2008) Histological comparison between implants retrieved from patients with and without osteoporosis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 37: 321-317.

Tommasini, S.M., Trinward, A., Acerbo, A.S., De Carlo, F., Miller, L.M. & Judex, S. (2012) Changes in intracortical microporosities induced by pharmaceutical treatment of osteoporosis as detected by high resolution micro-CT. *Bone* 50: 596-604.

Vashishth, D., Verborgt, O., Divine, G., Schaffler, M.B. & Fyhrie, D.P. (2000) Decline in osteocyte lacunar density in human cortical bone is associated with accumulation of microcracks with age. *Bone* 26: 375-380.

World Health Organization, 1994. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. World Health Organ technical report series 843: 1–129.

You, J., Yellowley, C.E., Donahue, H.J., Zhang, Y., Chen, Q. & Jacobs, C.R. (2000) Substrate deformation levels associated with routine physical activity are less stimulatory to bone cells relative to loading-induced oscillatory fluid flow. *Journal of Biomechanical Engineering* 122: 387–393.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de osteócitos tem fundamental importância no processo de controle da reabsorção da matriz óssea, uma vez que estas células tem a capacidade de ativar outras células ósseas para iniciar a atividade de remodelação em resposta a estímulos mecânicos (PALUMBO et al., 1990). Foi demonstrado que a diminuição da densidade de osteócitos no osso cortical humano está associada com o acúmulo de microfissuras e aumento da porosidade com a idade. A presença de microfraturas induz a interrupção do fluxo de fluido, a perda de nutrição, hipóxia, desprendimento de osteócitos da matriz extracelular e a apoptose de osteócitos. Todos esses fatores contribuem para a remodelação óssea, porém se estiverem presentes de forma exacerbada podem dificultar a cicatrização óssea (Bakker et al., 2004). Pacientes com osteoporose mostram um processo de remodelação óssea reduzida e arquitetura óssea alterada; e os resultados são consistentes em relação a função prejudicada dos osteoblastos em pacientes com osteoporose (Mullender et al., 2005). A osseointegração, que é medida pelo percentual de contato entre a superfície do implante e o osso, pode ser afetada não só pelas características do implante e do procedimento cirúrgico, mas também pelas variáveis dependentes do paciente que podem afetar a quantidade e a qualidade do osso (Mellado-Valero et al., 2010). Para alcançar a osseointegração de implantes é necessário garantir a sua estabilidade primária adequada (Mellado-Valero et al., 2010). Assim, a osteoporose, caracterizada pela perda de massa óssea, alteração da microestrutura e da redução da capacidade de regeneração do osso, é considerada um possível fator de risco para a colocação de implantes dentários (Lugero et al., 2000). Por outro lado, August et al. (2001) verificaram que a ausência de estrógeno no período de pós-menopausa pode ter um impacto sobre a cicatrização do implante na maxila, mas não na mandíbula. Giro et al. (2011) demonstraram que a deficiência de estrógeno não deve ser considerada um fator de risco para osseointegração do implante em osso mandibular. Entretanto, Giro et al. (2010), em um estudo realizado em camundongos, concluíram que a deficiência de estrógeno exerce uma influência negativa sobre o tecido ósseo ao redor de implantes, enquanto que a terapia de reposição de estrógeno e alendronato são eficazes contra a deficiência de qualidade óssea. Um estudo realizado por Duarte et al. (2005) mostrou que o alendronato

pode impedir a influência da deficiência de estrógeno sobre a cicatrização óssea ao redor de implantes de titânio. Além disso, Yildiz et al. (2010) verificou que o uso de bifosfonado melhora a osseointegração de implantes em coelhos com deficiência de estrógeno. Em um estudo in camundongos realizado por Du et al. (2014) em que utilizaram microscopia eletrônica de varredura para verificar a presença de células que estão em contato com a superfície do implante dentário. Foi demonstrado a ancoragem direta de osteócitos por meio de dendritos na superfície do implante de titânio. Isso sugere um importante papel regulador dos osteócitos e da sua rede lacunar-canalicular na manutenção da osseointegração de longo prazo. Então se fizer uma comparação deste estudo com a presente pesquisa, o número de osteócitos encontrados em pacientes com osteoporose poderá favorecer a manutenção da osseointegração. Por fim, no estudo realizado, foi verificado que as doenças do metabolismo ósseo (osteoporose e osteopenia), não tem influência sobre a densidade de osteócitos, este fato pode ser devido à administração de bifosfonados em pacientes com osteoporose. Esta informação pode ter um papel fundamental no diagnóstico e tratamento de pacientes em fase de pós-menopausa, o que pode melhorar o prognóstico no tratamento médico / odontológico principalmente no campo da implantodontia.

5. REFERÊNCIAS

Aarden EM, Nijweide PJ, van der Plas A, Alblas MJ, Mackie EJ, Horton MA, Helfrich MH. Adhesive properties of isolated chick osteocytes in vitro. *Bone*. 1996 Apr; 18(4):305-13.

August M, Chung K, Chang Y, Glowacki J. Influence of estrogen status on endosseous implant osseointegration. *J Oral Maxillofac Surg* 2001; 59: 1285–1289.

Abu-Id MH, Warnke PH, Gottschalk J, Springer I, Wiltfang J, Acil Y, Russo PA, Kreusch T. "Bis-phossy jaws" - high and low risk factors for bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *J Craniomaxillofac Surg*. 2008 Mar; 36(2):95-103.

Allen MR, Burr DB. Mandible matrix necrosis in beagle dogs after 3 years of daily oral bisphosphonate treatment. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008 May; 66(5):987-94.

Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 1994; 843:1-129.

Bakker A, Klein-Nulend J, Burger E. Shear stress inhibits while disuse promotes osteocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Aug 6; 320(4):1163-8.

Barros RR, Degidi M, Novaes AB, Piattelli A, Shibli JA, Iezzi G. Osteocyte density in the peri-implant bone of immediately loaded and submerged dental implants. *J Periodontol*. 2009 Mar; 80(3):499-504.

Batra GS, Hailey L, Freemont AJ, Andrew G, Saunders PT, Hoyland JA, Braidman IP. Evidence for cell-specific changes with age in expression of oestrogen receptor (ER) alpha and beta in bone fractures from men and women. *J Pathol*. 2003 May; 200(1):65-73.

Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*. 2011 Feb; 26(2):229-38.

Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*. 2008 Apr; 42(4):606-15.

Burger EH, Klein-Nulend J, Smit TH. Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon--a proposal. *J Biomech.* 2003 Oct; 36(10):1453-9.

Busse B, Djonic D, Milovanovic P, Hahn M, Püschel K, Ritchie RO, Djuric M, Amling M. Decrease in the osteocyte lacunar density accompanied by hypermineralized lacunar occlusion reveals failure and delay of remodeling in aged human bone. *Aging Cell.* 2010 Dec; 9(6):1065-75.

Cao T, Shirota T, Yamazaki M, Ohno K, Michi KI. Bone mineral density in mandibles of ovariectomized rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2001 Dec; 12(6):604-8.

Consensus Development Conference on Osteoporosis. Hong Kong, April 1-2, 1993. *Am J Med.* 1993 Nov 30; 95(5A):1S-78S.

Cowin SC, Moss-Salentijn L, Moss ML. Candidates for the mechanosensory system in bone. *J Biomech Eng.* 1991 May; 113(2):191-7.

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

Dhillon S, Lyseng-Williamson KA. Zoledronic acid : a review of its use in the management of bone metastases of malignancy. *Drugs.* 2008; 68(4):507-34.

Du Z, Ivanovski S, Hamlet SM, Feng JQ, Xiao Y. The Ultrastructural Relationship Between Osteocytes and Dental Implants Following Osseointegration. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2014 Jul 10.

Duarte PM, de Vasconcelos Gurgel BS, Sallum AW, Fihlo GR, Sallum EA, Nociti FH Jr. Alendronate therapy may be effective in the prevention of bone loss around titanium implants inserted in estrogen-deficient rats. *J Periodontol* 2005; 76: 107–114.

Dunn O.J. Multiple comparisons among means. *Journal of the American Statistical Association* 1961; 56: 52–64.

Dunstan CR, Somers NM, Evans RA. Osteocyte death and hip fracture. *Calcif Tissue Int.* 1993; 53 Suppl 1:S113-6; discussion S116-7.

Estilo CL, Van Poznak CH, Williams T, et al. Osteonecrosis of the maxilla and mandible in patients with advanced cancer treated with bisphosphonate therapy. *Oncologist* 2008; 13:911-920.

Fleisch H, Russell RG, Bisaz S, Casey PA, Mühlbauer RC. The influence of pyrophosphate analogues (diphosphonates) on the precipitation and dissolution. *Calcif Tissue Res.* 1968:Suppl:10-10a.

Fujiwara S, Hamaya E, Sato M, Graham-Clarke P, Flynn JA, Burge R. Systematic review of raloxifene in postmenopausal Japanese women with osteoporosis or low bone mass (osteopenia). *Clin Interv Aging.* 2014 Nov 5;9:1879-1893.

Giro G, Coelho PG, Pereira RM, Jorgetti V, Marcantonio E Jr, Orrico SR. The effect of oestrogen and alendronate therapies on postmenopausal bone loss around osseointegrated titanium implants. *Clin Oral Implants Res.* 2011 Mar;22(3):259-64.

Giro G, Coelho PG, Sales-Pessoa R, Pereira RM, Kawai T, Orrico SR. Influence of estrogen deficiency on bone around osseointegrated dental implants: an experimental study in the rat jaw model. *J Oral Maxillofac Surg.* 2011 Jul;69(7):1911-8.

Haga M, Nozawa-Inoue K, Li M, Oda K, Yoshie S, Amizuka N, Maeda T. A morphological analysis on the osteocytic lacunar canalicular system in bone surrounding dental implants. *Anat Rec (Hoboken).* 2011 Jun; 294(6):1074-82.

Hanson J. Standardization of proximal femur BMD measurements. International Committee for Standards in Bone Measurement. *Osteoporos Int.* 1997; 7(5):500-1.

Harris WH, Heaney RP. Skeletal renewal and metabolic bone disease. *N Engl J Med.* 1969 Feb 6;280(6):303-11.

Hernandez CJ, Majeska RJ, Schaffler MB. Osteocyte density in woven bone. *Bone.* 2004 Nov; 35(5):1095-9.

Hesse B, Langer M, Varga P, Pacureanu A, Dong P, Schrof S, Männicke N, Suhonen H, Olivier C, Maurer P, Kazakia GJ, Raum K, Peyrin F. Alterations of mass density and 3D osteocyte lacunar properties in bisphosphonate-related osteonecrotic human jaw bone, a synchrotron μ CT study. *PLoS One*. 2014 Feb 21; 9(2):e88481.

Huja SS, Fernandez SA, Phillips C, Li Y. Zoledronic acid decreases bone formation without causing osteocyte death in mice. *Arch Oral Biol*. 2009 Sep; 54(9):851-6.

Johnston CC Jr, Lindsay R. Updated data on proximal femur bone mineral levels of US adults. *Osteoporos Int*. 1998;8(5):468-89.

Kalajzic I, Matthews BG, Torreggiani E, Harris MA, Divieti Pajevic P, Harris SE. In vitro and in vivo approaches to study osteocyte biology. *Bone* 2013; 54:296–306.

Karaguzel G, Holick MF. Diagnosis and treatment of osteopenia. *Rev Endocr Metab Disord*. 2010 Dec;11(4):237-51.

Kim HS, Yang SO. Quality Control of DXA System and Precision Test of Radiotechnologists. *J Bone Metab*. 2014 Feb; 21(1):2-7.

Kleerekoper M, Villanueva AR, Stanciu J, Rao DS, Parfitt AM. The role of three-dimensional trabecular microstructure in the pathogenesis of vertebral compression fractures. *Calcif Tissue Int*. 1985 Dec; 37(6):594-7.

Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Jan; 36(1):1-8.

Kruskal WH, Wallis WA. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*. 1952; 47: 583–621.

Lanyon LE. Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif Tissue Int*. 1993; 53 Suppl 1:S102-6; discussion S106-7.

Lerner UH. Bone remodeling in post-meno- pausal osteoporosis. *J Dent Res*. 2006; 85:584–595.

Liberman UA, Weiss SR, Bröll J, Minne HW, Quan H, Bell NH, Rodriguez-Portales J, Downs RW Jr, Dequeker J, Favus M. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. The Alendronate Phase III Osteoporosis Treatment Study Group. *N Engl J Med*. 1995 Nov 30; 333(22):1437-43.

Looker AC, Wahner HW, Dunn WL, Calvo MS, Harris TB, Heyse SP, Johnston CC Jr, Lindsay R. Updated data on proximal femur bone mineral levels of US adults. *Osteoporos Int*. 1998;8(5):468-89.

Looker AC, Wahner HW, Dunn WL, Calvo MS, Harris TB, Heyse SP, Ma YL, Dai RC, Sheng ZF, Jin Y, Zhang YH, Fang LN, Fan HJ, Liao EY. Quantitative associations between osteocyte density and biomechanics, microcrack and microstructure in OVX rats vertebral trabeculae. *J Biomech*. 2008; 41(6):1324-32.

Lugero GG, de Falco Caparabo V, Guzzo ML, Koniz G Jr, Jorgetti V. Histomorphometric evaluation of titanium implants in osteoporotic rabbits. *Implant Dent* 2000; 9: 303–309.

Mellado-Valero A, Ferrer-García JC, Calvo-Catalá J, Labaig-Rueda C. Implant treatment in patients with osteoporosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010 Jan 1; 15(1):e52-7.

Migliorati CA, Schubert MM, Peterson DE, Seneda LM. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of mandibular and maxillary bone: an emerging oral complication of supportive cancer therapy. *Cancer* 2005; 104: 83–89.

Mullender MG, Huiskes R. Proposal for the regulatory mechanism of Wolff's law. *J Orthop Res*. 1995 Jul; 13(4):503-12.

Mullender MG, Tan SD, Vico L, Alexandre C, Klein-Nulend J. Differences in osteocyte density and bone histomorphometry between men and women and between healthy and osteoporotic subjects. *Calcif Tissue Int*. 2005 Nov; 77(5):291-6.

Mullender MG, Van der Meer DD, Huiskes R, Lips P. Osteocyte density changes in aging and osteoporosis. *Bone*. 1996 Feb; 18(2):109-13.

Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. NIH Consens Statement. 2000 Mar 27-29; 17(1):1-45.

Otomo-Corgel J. Osteoporosis and osteopenia: implications for periodontal and implant therapy. *Periodontol 2000*. 2012 Jun;59(1):111-39.

Palumbo C, Palazzini S, Zaffe D, Marotti G. Osteocyte differentiation in the tibia of newborn rabbit: An ultrastructural study of the formation of cytoplasmic processes. *Acta Anat (Basel)* 1990;137:350–358.

Parfitt AM. Age-related structural changes in trabecular and cortical bone:cellular mechanisms and biomechanical consequences. *Calcif Tissue Int*. 1984; 36 Suppl 1:S123-8.

Parfitt AM. Bone age, mineral density, and fatigue damage. *Calcif Tissue Int*. 1993; 53 Suppl 1:S82-5; discussion S85-6.

Parfitt AM, Villanueva AR, Foldes J, Rao DS. Relations between histologic indices of bone formation: implications for the pathogenesis of spinal osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 1995 Mar; 10(3):466-73.

Piattelli A, Scarano A, Quaranta M. High-precision, cost-effective cutting system for producing thin sections of oral tissues containing dental implants. *Biomaterials*. 1997 Apr; 18(7):577-9.

Polymeris A, Michalakis K, Sarantopoulou V. Secondary osteoporosis – an endocrinological approach focusing on underlying mechanisms. *Endocr Regul*. 2013 Jul; 47(3):137-48.

Power J, Loveridge N, Rushton N, Parker M, Reeve J. Osteocyte density in aging subjects is enhanced in bone adjacent to remodeling haversian systems. *Bone*. 2002 Jun; 30(6):859-65.

Price C, Zhou X, Li W, Wang L. Real-time measurement of solute transport within the lacunar-canalicular system of mechanically loaded bone: direct evidence for load-induced fluid flow. *J Bone Miner Res*. 2011 Feb; 26(2):277-85.

Qiu S, Rao DS, Palnitkar S, Parfitt AM. Relationship between osteocyte density and bone formation rate in human cancellous bone. *Bone* 2002; 31:709-711.

Qiu S, Rao DS, Palnitkar S, Parfitt AM. Reduced iliac cancellous osteocyte density in patients with osteoporotic vertebral fracture. *J Bone Miner Res.* 2003 Sep; 18(9):1657-63.

Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future. *Lancet.* 2011 Apr 9; 377(9773):1276-87.

Riggs BL, Parfitt AM. Drugs used to treat osteoporosis: the critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling. *J Bone Miner Res.* 2005 Feb; 20(2):177-84.

Rodan GA. Mechanical loading, estrogen deficiency, and the coupling of bone formation to bone resorption. *J Bone Miner Res.* 1991 Jun; 6(6):527-30.

Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science.* 2000 Sep 1; 289(5484):1508-14.

Roholl PJ, Blauw E, Zurcher C, Dormans JA, Theuns HM. Evidence for a diminished maturation of preosteoblasts into osteoblasts during aging in rats: an ultrastructural analysis. *J Bone Miner Res.* 1994 Mar; 9(3):355-66.

Shibli JA, Aguiar KC, Melo L, d'Avila S, Zenóbio EG, Faveri M, Iezzi G, Piattelli A. Histological comparison between implants retrieved from patients with and without osteoporosis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008 Apr; 37(4):321-7.

Sterck JG, Klein-Nulend J, Lips P, Burger EH. Response of normal and osteoporotic human bone cells to mechanical stress in vitro. *Am J Physiol.* 1998 Jun; 274(6 Pt 1):E1113-20.

Tommasini SM, Trinward A, Acerbo AS, De Carlo F, Miller LM, Judex S. Changes in intracortical microporosities induced by pharmaceutical treatment of osteoporosis as detected by high resolution micro-CT. *Bone.* 2012 Mar; 50(3):596-604.

Traini T, Murmura G, Piattelli M, Scarano A, Pettinicchio M, Sinjari B, Caputi S. Effect of nanoscale topography of titanium implants on bone vessel network, osteocytes, and mineral densities. *J Periodontol*. 2013 Oct; 84(10):e40-7.

Vashishth D, Gibson G, Kimura J, Schaffler MB, Fyhrie DP. Determination of bone volume by osteocyte population. *Anat Rec* 2002; 267:292-295.

Vashishth D, Verborgt O, Divine G, Schaffler MB, Fyhrie DP. Decline in osteocyte lacunar density in human cortical bone is associated with accumulation of microcracks with age. *Bone*. 2000 Apr; 26(4):375-80.

Wang HL, Weber D, McCauley LK. Effect of long-term oral bisphosphonates on implant wound healing: Literature review and a case report. *J Periodontol* 2007; 78:584-594.

Yildiz A, Esen E, Kurkçu M, Damlar I, Daglioglu K, Skova T. Effect of zoledronic acid on osseointegration of titanium implants: an experimental study in an ovariectomized rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg* 2010; 68: 515–523.

You J, Yellowley CE, Donahue HJ, Zhang Y, Chen Q, Jacobs CR. Substrate deformation levels associated with routine physical activity are less stimulatory to bone cells relative to loading-induced oscillatory fluid flow. *J Biomech Eng*. 2000 Aug; 122(4):387-93.

6. ANEXOS

6.1. COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO ARTIGO PELA REVISTA

Manuscripts with Decisions

Manuscript ID	Manuscript Title	Date Submitted	Date Decided	Status	Actions
COIR-Jun-14-OR-4158.R1	Influence of osteoporosis on the osteocyte density of human mandibular bone samples: a controlled histological human study [View Submission]	05-Nov-2014	21-Nov-2014	AE: Lang, Niklaus EIC: Lang, Niklaus EO: Baur, Brigitte <ul style="list-style-type: none"> • Accept (21-Nov-2014) view decision letter	
COIR-Jun-14-OR-4158	Influence of osteoporosis on the osteocyte density of human mandibular bone samples: a controlled histological human study [View Submission]	21-Jul-2014	26-Aug-2014	AE: Lang, Niklaus EIC: Lang, Niklaus EO: Baur, Brigitte <ul style="list-style-type: none"> • Major Revision (26-Aug-2014) • a revision has been submitted view decision letter	a revision has been submitted (COIR-Jun-14-OR-4158.R1)

[▲ top](#)

6.2. COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Guarulhos, 08 de novembro de 2007.

Exmo. Sr.
Prof. Jamil A. Shibli

PARECER Nº 147/2007

Referência: **Aprovação de Projeto**

SISNEP/308 - "Avaliação clínica, imunológica, microbiológica e histológica de implantes em pacientes com Osteoporose"

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos analisou o Projeto de Pesquisa de sua autoria "Avaliação clínica, imunológica, microbiológica e histológica de implantes em pacientes com Osteoporose" - SISNEP/308, na reunião de 06.11.2007, e no uso das competências definidas na Res. CNS 196/96, considerou o Projeto acima **aprovado**.

As orientações abaixo devem ser consideradas pelo Pesquisador Responsável durante a realização da pesquisa, visando que a mesma se desenvolva respeitando os padrões éticos:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- Eventuais modificações ou emendas e eventos adversos ao protocolo, devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.
- Esclarecemos a necessidade da apresentação de relatório de andamento até **15.04.10** e relatório final até **31.10.12**.

Luciene Cristina de Figueiredo
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa