



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**ANÁLISE DO REPARO ÓSSEO COM ALENDRONATO DE SÓDIO ASSOCIADO
AO OSSO BOVINO LIOFILIZADO (Bio-Oss®) - ESTUDO RADIOMICROGRÁFICO
EM CALVÁRIA DE COELHOS**

Stela Maris Wanderley Rocha

**João Pessoa-PB
2013**

STELA MARIS WANDERLEY ROCHA

**ANÁLISE DO REPARO ÓSSEO COM ALENDRONATO DE SÓDIO ASSOCIADO
AO OSSO BOVINO LIOFILIZADO (Bio-Oss®) - ESTUDO RADIOMICROGRÁFICO
EM CALVÁRIA DE COELHOS**

Tese apresentada ao Programa Integrado de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba-UEPB, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na Área de Concentração em Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Limeira Júnior
Co-Orientador: Prof. Dr. Fabiano Rodrigues Gonzaga

**João Pessoa-PB
2013**

STELA MARIS WANDERLEY ROCHA

**ANÁLISE DO REPARO ÓSSEO COM ALENDRONATO DE SÓDIO ASSOCIADO
AO OSSO BOVINO LIOFILIZADO (Bio-Oss®) - ESTUDO RADIOMICROGRÁFICO
EM CALVÁRIA DE COELHOS**

João Pessoa, 05 de março de 2013.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Francisco Limeira Júnior
Orientador
(UFPB/DCOS/CCS/PPGO)

Prof. Dr. Frederico Barbosa de Sousa
UFPB/DCOS/CCS/PPGO

Profa. Dra. Andrea Sarmento Queiroga
UNIPÊ

Profa. Dra. Tânia Lemos Coelho Rodrigues
UFPB/DCOS/CCS/PPGO

Profa. Dra. Daniela Nascimento Silva
DCO/CCS/PPGO/UFES

Dedico esse momento. . .

Aos meus pais Norival e Lourdes (in memoriam),

À vocês que me deram a vida, ensinando-me os valores humanos que fazem com que a vida valha a pena... Do meu pai, o exemplo de honestidade, prioridade aos estudos e que somente pelo nosso esforço e trabalho justos é que conquistamos respeito e espaço. À minha mãe, minha fortaleza, meu exemplo de vida, de simplicidade e amor ao próximo. Seus ensinamentos foram e continuam sendo muito importantes em todos os momentos da minha vida.
Amo vocês!!!

Ao meu marido Fernando,

Como expressar o meu sentimento por você nesse momento? Sou eternamente grata pelo apoio durante essa minha jornada, sendo por muitas vezes PAI e MÃE, dizendo sempre: não se preocupe, resolva os problemas do dourado e dos meninos, cuido eu. Foi muito importante a sua compreensão pelo meu cansaço, ausência e acima de tudo por saber que podia e posso contar com você em todos os momentos da minha vida...
Te Amo!!!

Aos meus queridos filhos Nando , Renata e Maria Eduarda,

Como seria minha vida sem vocês? ...
Vocês são meus anjos aqui na terra! Obrigada por permitirem que eu experimentasse a melhor e mais surpreendente forma de AMOR, o amor incondicional de uma mãe pelo filho... Desculpem-me pelas ausências.
Foram muitas... Obrigada pelo carinho, força e principalmente pela paciência, saibam que vocês são um presente de DEUS.



Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal da Paraíba**, na pessoa da Magnífica Reitora Prof. Dra. Margareth de Fatima Formiga de Melo.

Ao **Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal da Paraíba** no nome da Profa. Dra. Maria Sueli Marques Soares, coordenadora do Programa.

Ao **Corpo Docente do programa de Pós-Graduação da Universidade Federal da Paraíba**, muito obrigada pelo convívio, disponibilidade e por terem permitido aprimorar meus conhecimentos, através dos conhecimentos transmitidos por vocês.

Ao **Prof. Dr. Fabiano Gonzaga Rodrigues**, ex-coordenador do Programa de Pós-Graduação, pela amizade, por ter me acolhido nessa casa e pela co-orientação do trabalho.

Aos Colegas do Doutorado **Alysson, Daniela, Dayane, Iolanda, Marcos e Roberta**, colegas que ao longo dessa caminhada aprendi a admirar pela dedicação, profissionalismo e companheirismo, vocês são parte da minha história.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal da Paraíba, em especial à **Raissa e Jaqueline**, pela atenção e disponibilidade.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo incentivo financeiro, essenciais para elaboração desse trabalho.

Ao **Biotério do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba - LTF/UFPB**, em especial ao técnico **José Crispim Duarte**.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Foram tantas as pessoas que participaram da minha trajetória, alguns verdadeiros anjos terrestres, nomear os agradecimentos é muito difícil, corremos o risco de esquecer pessoas que foram muito importantes durante nossa caminhada...

Aqui seguem meus verdadeiros agradecimentos a todos que de alguma, à sua maneira, plantaram uma sementinha de coragem e incentivo, durante os momentos de alegrias e tristezas...

Ao meu **orientador Prof. Dr. Francisco de Assis Limeira Júnior** pela orientação e acompanhamento indispensável para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus irmãos:

QUITÉRIA, cuja inteligência e integridade me são fontes de eterna admiração, agradeço pelo carinho, amor e força em todos os momentos de minha vida, você é um dos meus anjos aqui na terra!

MARY, você tem sido uma amiga, irmã e companheira de todas as horas... Obrigada pela força!

VANDA, você é a alegria em pessoa, desculpe pelas ausências do convívio familiar e obrigada pelas palavras ditas na hora certa...

WANDECLEY, pelas horas que compartilhamos e pelos conselhos dados em todos os momentos de minha vida.

Saibam que vocês são a principal fonte do nosso passado, obrigada pela força, amizade e pela nossa união. AMO VOCÊS!!!

Ao **Prof. Dr. Frederico Barbosa de Sousa** pela competência e acima de tudo, por responder as minhas dúvidas, compartilhando seus conhecimentos em vários momentos dessa tese.

A **Profa. Dra. Daniela Nascimento Silva** pela disponibilidade, incentivo e principalmente pelo exemplo de docência. Seu amor pela pesquisa é contagiante.

Ao **Prof. Rafael Mattos** que acreditou e confiou em mim, por todas as oportunidades de trabalho, pela valiosa orientação tanto acadêmica quanto pessoal, pelo apoio, confiança, amizade e incentivo.

A minha amiga e “irmã paraibana” **Roberta Moreira**, amiga de todas as horas, que com paciência e carinho me ajudou desde o início dessa trajetória. Saiba que as verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias e que o importante não é o que temos na vida, mas quem temos, e que bons amigos são a família que nos permitiram escolher... Sentirei saudades!

Á minha amiga do doutorado **Daniela**, com quem dividi as alegrias e tristezas da adaptação a uma nova vida; você foi muito importante durante nossa estada em João Pessoa, juntas compartilhávamos nossos anseios e angustias. Valeu pela força!

Enfim, a todos que, de maneira direta ou indireta, proporcionaram momentos maravilhosos e de contentamentos, que torceram e acreditaram em mim e que estiveram sempre contribuindo com todas as minhas realizações pessoais e profissionais.

Muito obrigada!!!

Momentos ...

*Foram tantos... vividos, amados, sofridos e às vezes esquecidos.
Momentos de alegrias, tristezas e de infinitas belezas...*

*Durante esses momentos aconteceram
algumas perdas... quanta tristeza!
Meus momentos passados me trazem à realidade desse momento...*

*Quantas interrogações, incertezas, ausências, tristezas, lágrimas, sorrisos, que me
conduziram a esse momento tão esperado e aguardado...*

*No passado momentos ansiados,
desejados, sonhados.
Nesse momento... a sensação
do sonho concretizado!*

*Como gostaria que nesse momento pudesse recuperar os momentos perdidos, esquecidos,
mas não aqueles sofridos, principalmente pela perda dos entes queridos...*

*Tão bom seria que nesse momento pudesse tê-los, para juntos comemorarmos essa
vitória que não é só minha, mas principalmente de vocês que abdicaram dos seus
momentos para que os meus pudessem se concretizar...*

*Stela Maris
(para meus pais Norival e Lourdes, in memoriam)*



Resumo

RESUMO

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito do alendronato de sódio (ALN), nas concentrações de 0,5 (5mg/ml) e 1% (10mg/ml), associadas ou não ao osso bovino liofilizado (Bio-Oss®), na reparação de defeitos ósseos produzidos em calvária de coelhos. Foram utilizados 40 coelhos machos brancos da raça Nova Zelândia. Na calvária de cada animal, foram confeccionados dois defeitos medindo 10 mm de diâmetro. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (n=8 cada): GI = Bio-Oss®; GII = Bio-Oss®+ALN 0,5%; GIII = Bio-Oss®+ALN 1%; GIV = ALN 0,5%; GV = ALN 1%. A cavidade esquerda foi preenchida pela substância correspondente a cada grupo experimental e a cavidade direita preenchida por coágulo sanguíneo autógeno (controle de cada grupo). Todas as cavidades foram forradas e cobertas por membrana biológica. Os animais foram eutanasiados aos 30 e 60 dias após a craniotomia. O percentual de neoformação óssea foi avaliado por meio de análise radiomicrográfica da calvária. As imagens obtidas por radiomicrografia foram analisadas através do programa de domínio público *Image J*®, para avaliar quantitativamente o percentual de reparo ósseo. Os valores obtidos pelo *Image J*® foram submetidos à análise com auxílio do *software* SPSS® *Statistics*, por meio de estatística descritiva (média, desvio-padrão e intervalos de confiança) e inferencial (teste “t” *Student* e ANOVA/ *Tukey*). Na comparação intragrupos, os resultados demonstraram que nos grupos GI, GII e GIII o percentual de reparo foi significativamente mais elevado no lado experimental em relação aos respectivos controles; nos grupos GIV e GV não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no percentual de reparo entre os lados experimental e controle. Na comparação intergrupos, os resultados mostraram os seguintes percentuais de reparo aos 30 dias: GI = 61,91% ($\pm 10,61$), GII = 80,39 ($\pm 8,68$), GIII = 81,60% ($\pm 5,42$), GIV = 48,45% ($\pm 6,54$), GV = 41,45% ($\pm 8,98$). Aos 60 dias: GI = 83,23% ($\pm 14,43$), GII = 98,72% ($\pm 2,54$), GIII = 92,66% ($\pm 9,22$), GIV = 50,18% ($\pm 3,03$), GV = 37,46% ($\pm 6,26$). Conclui-se que a adição do ALN, nas concentrações de 0,5 e 1%, ao osso bovino liofilizado aplicado topicamente nos defeitos ósseos acelerou o processo de reparo ósseo, sendo mais significativo na menor concentração. O uso do ALN isoladamente retardou o processo de reparo ósseo, mas sem significância estatística.

Palavras-chave¹: Tecido ósseo; Alendronato; Substitutos ósseos; Coelho.

¹ DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. Disponível em: www.decs.bvs.br. Acesso em: 27 de outubro de 2012



Abstract

ABSTRACT

This study aims to evaluate the effect of 0.5% (5mg/ml) and 1% (10mg/ml) alendronate sodium (ALN) associated or not with lyophilized bovine bone (Bio-Oss®) on the repair of calvaria bone defects in rabbits. Two bony defects, 10mm diameter circular, were created in 40 male New Zealand white rabbits. The animals were randomized into five (n = 8) groups: GI = Bio-Oss®; GII = Bio-Oss® + ALN 0.5%; GIII = Bio-Oss® + ALN 1%; GIV = ALN 0.5%; GV = ALN 1%. The left defect was filled with the corresponding substance of each experimental group and the right defect was filled with autogenous blood clot (control). All cavities were lined and covered with a biological membrane. The animals were euthanized 30 and 60 days after craniotomy. The percentage of new bone formation was assessed by microradiographic analysis of calvaria. The images obtained were analyzed using the public domain program Image J®, to assess quantitatively the percentage of bone repair. The values obtained were analyzed using the software SPSS® Statistics, using descriptive statistics (mean, standard deviation and confidence intervals) and inferential ("t" - Student and ANOVA/Tukey). The intragroup results showed that in GI, GII and GIII the percentage of bone repair was significantly higher in the experimental side compared to their respective controls; and was not statistically difference in GIV and GV groups, between experimental and controls sides. The intergroup results showed the following percentage of repair at 30 days: GI = 61.91% (± 10.61), GII = 80.39 (± 8.68), GIII = 81.60% (± 5.42), GIV = 48.45% (± 6.54), GV = 41.45% (± 8.98) and at 60 days: GI = 83.23% (± 14.43), GII = 98.72% (± 2.54), GIII = 92.66% (± 9.22), GIV = 50.18% (± 3.03), GV = 37.46% (± 6.26). It is concluded that the addition of alendronate in concentrations of 0.5 and 1%, to lyophilized bovine bone, accelerate the process of bone repair, being more significant in lower concentration. The use of ALN alone delayed the process of bone repair, but without statistical significance.

Key-Words²: Bone and Bones; Alendronate; Bone Substitutes; Rabbit.

² DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. Disponível em: www.decs.bvs.br. Acesso em: 27 de outubro de 2012.



Listas de figuras, tabelas, gráficos e quadros

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 01- A, B e C: Estrutura química do pirofosfato e de diferentes bisfosfonatos	44
Figura 02 - Mecanismo de ação molecular dos bisfosfonatos.....	48
Figura 03 - Coelho macho branco da raça Nova Zelândia, modelo animal utilizado na pesquisa.....	71
Figura 04 - Coelho Nova Zelândia mantido em gaiola individual.....	72
Figura 05 - Cloridrato de Xilazina 2% (Rompun®) e Cloridrato de Ketamina 1% (Dopalen) utilizados para anestesia geral.....	73
Figura 06 - Anestesia local infiltrativa com cloridrato de mepivacaína 2% e epinefrina 1:100.000.....	74
Figura 07 - A e B – Incisão sagital linear na região frontoparietal, medindo cerca de 4cm de extensão; C) Exposição da calvária após descolamento mucoperiostal.....	74
Figura 08 - Confeção do defeito ósseo utilizando broca trefina de 10 mm de diâmetro interno, montada em contra-ângulo.....	75
Figura 09 - Fragmentos ósseos removidos pela broca trefina.....	75
Figura 10 - Defeitos ósseos bilaterais nos ossos parietais.....	75
Figura 11 - A) Membrana de cortical óssea reabsorvível (GenDerm, Baumer®) e B) respectiva embalagem com especificações.....	76
Figura 12 - A) Defeito ósseo preenchido com coágulo sanguíneo; B) Defeito forrado com membrana biológica e embebido em solução de ALN 0,5%; C) Defeito ósseo preenchido com Bio-Oss®.....	76
Figura 13 – A) Ilustração dos grânulos de Bio-Oss® 1.0-2.0mm e B) respectiva embalagem com especificações.....	77
Figura 14 – Defeitos cobertos com membrana biológica.....	78
Figura 15 – A) Aparelho Faxitron X-Ray ® modelo MX20 digital. B) Detalhe do painel de controle do aparelho.....	79
Figura 16 – Calvária posicionada no interior do aparelho Faxitron X-Ray ® para obtenção de imagem radiomicrográfica digitalizada.....	80
Figura 17 – Janela principal do programa <i>Image J</i> ®, mostrando imagem da calvária obtida pela radiomicrografia, já duplicada. Observe a imagem dos defeitos ósseos: à esquerda, cavidade experimental, e à direita, cavidade controle.....	81

Figura 18 – Histograma obtido a partir da imagem de um defeito ósseo controle. Observa-se que os dados da imagem não foram perdidos, visto que os valores estão entre 0 e 255. O eixo horizontal determina os tons de cinza e o vertical a probabilidade de ocorrência de tons de cinza na imagem. 82

Figura 19 - Imagem dos defeitos ósseos selecionados (círculo amarelo) para obtenção das medidas do reparo ósseo. **A)** defeito experimental; **B)** defeito controle; e **C)** porção superior da calvária em que o osso não foi manipulado..... 82

Figura 20 - Planilha do Programa Excel® contendo os valores da área do defeito e a média de reparo: 1- cavidade experimental; 2- tecido ósseo não manipulado; 3- cavidade controle..... 83

LISTA DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1 - Percentual médio de reparação óssea em defeito confeccionado em calvária de coelhos no lado experimental, aos 30 dias...	94
Gráfico 2 - Percentual médio de reparação óssea em defeito produzido em calvária de coelhos no lado experimental aos 60 dias.....	94
Gráfico 3 - Valor médio do percentual de reparo ósseo dos defeitos confeccionados em calvária de coelhos no lado experimental.....	95

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Percentual de reparo ósseo em defeitos na calvária de coelhos nos períodos de 30 e 60 dias - GI – (Bio-Oss®).....	87
Tabela 2 - Percentual de reparo ósseo em defeitos na calvária de coelhos nos períodos de 30 e 60 dias - Grupo II– (Bio-Oss® +ALN 0,5%).....	88
Tabela 3 - Percentual de reparo ósseo em defeitos na calvária de coelhos nos períodos de 30 e 60 dias - Grupo III – (Bio-Oss® +ALN 1%).....	89
Tabela 4 - Percentual de reparo ósseo em defeitos na calvária de coelhos nos períodos de 30 e 60 dias - Grupo IV (ALN 0,5%).....	90
Tabela 5 - Percentual de reparo ósseo em defeitos na calvária de coelhos nos períodos de 30 e 60 dias - Grupo V (ALN 1%).....	90
Tabela 6 - Comparação do percentual (média e desvio-padrão) de neoformação óssea nos defeitos de calvária de coelhos, intra e intergrupos.....	92

LISTA DE QUADROS

	Pág.
Quadro 01 - Distribuição dos animais nos grupos experimentais.....	73



Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ALN	Alendronato de sódio
ATP	Adenosina trifosfato
BMP	Proteína morfogenética óssea (do inglês, <i>Bone Morphogenetic Protein</i>)
BF	Bisfosfonato (s)
Ca	Cálcio
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CCS	Centro de Ciências da Saúde
cm	Centímetro (s)
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Com.	Comércio
ESALQ	Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
DP	Desvio-padrão
et al.	e outros
EV	Endovenosa
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FO	Faculdade de Odontologia
Fig.	Figura
FPPS	Farnesil pirofosfatase sintetase
g	Gramma (s)
GGPP	Geranilgeranil pirofosfatase
GTP	Guanosina trifosfato
h	Hora
H ⁺	Hidrogênio

H ₀	Hipótese nula
H ₁	Hipótese um
H ₂	Hipótese dois
H ₃	Hipótese três
H ₄	Hipótese quatro
HA	Hidroxiapatita
IC	Intervalo de confiança
Ind.	Indústria
IPP	Isoprenóide difosfato
ISQ	Quociente de estabilidade do implante
Kg	quilograma
kVp	Quilovoltagem pico
l	Litro
LEA	Laboratório de Experimentação Animal
Ltda.	Limitada
LTF	Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
m	Metro
M	Média
mÅ	Miliampère ou miliamperagem
mg	Miligrama (s)
min	Minuto (s)
ml	Mililitro (s)
mm	Milímetro (s)
Mmol	Milimolar
mM	Milimolar
mol	molar
n	Número

Nº	Número
OH	Hidroxila
p	probabilidade de erro
Pag.	Página
p. ex.	Por exemplo
pH	Potencial hidrogeniônico
pixel	<i>Picture element</i>
PO	Fosfato
PPGO	Programa de Pós-Graduação em Odontologia
P-C-P	Átomo de fosfato
P-O-P	Pirofosfato
RJ	Rio de Janeiro
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo (s)
SP	São Paulo
SPSS	Statistic Packet of Social Science
TGF-β	Fator de crescimento tumoral beta
TNT	Tecido não tecido
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
USP	Universidade Federal de São Paulo
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial (do inglês, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
www	World wide web – Rede internacional de computador
μmol	Micromolar
μm	Micrometro (s)
®	Marca registrada
°C	Grau (s) Celsius

%	Por cento
$\pm$	Mais ou menos
<	Menor
$\leq$	Menor ou igual
=	Igual
γ	Gama
δ	Ômega



Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	29
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	34
2.1 TECIDO ÓSSEO.....	34
2.1.1 Células do Tecido Ósseo.....	36
2.2 REPARO ÓSSEO.....	39
2.3 BISFOSFONATOS.....	42
2.3.1 Mecanismo de Ação dos Bisfosfonatos.....	46
2.3.2 Alendronato de Sódio.....	49
2.4 ASSOCIAÇÃO OSSO BOVINO LIOFILIZADO + BIFOSFONATOS.....	66
3 PROPOSIÇÃO.....	68
3.1 OBJETIVO GERAL.....	68
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	68
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	70
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	70
4.2 PROBLEMA.....	70
4.3 HIPÓTESES.....	70
4.4 SELEÇÃO E TAMANHO DA AMOSTRA.....	71
4.5 ACONDICIONAMENTO E ALIMENTAÇÃO DOS ANIMAIS.....	71
4.6 DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS.....	72
4.7 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	73
4.8 EUTANÁSIA.....	78
4.9 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	78
4.10 ANÁLISE RADIOMICROGRÁFICA.....	79
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	83
5 RESULTADOS.....	86
5.1 COMPARAÇÃO INTRAGRUPOS (EXPERIMENTAL X RESPECTIVO CONTROLE)	86
5.1.1 Grupo I (Bio-Oss®).....	86
5.1.2 Grupo II (Bio-Oss® + ALN 0,5%).....	87
5.1.3 Grupo III (Bio-Oss® +ALN 1%).....	88
5.1.4 Grupo IV (ALN 0,5%).....	89
5.1.5 Grupo V (ALN 1%).....	90

5.2 COMPARAÇÃO INTERGRUPOS.....	91
6 DISCUSSÃO.....	97
7 CONCLUSÕES.....	107
REFERÊNCIAS.....	109

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Projeto de Pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).....	120
ANEXO B – Laudo farmacêutico da manipulação da solução de Alendronato de sódio nas concentrações de 0,5 e 1%, emitido por Ao Farmacêutico – Farmácia de Manipulação Ltda.....	121
ANEXO C – Conversão do Alendronato de Sódio – Diluição/Concentração.....	123



Introdução

1 INTRODUÇÃO³

O tecido ósseo, um dos mais resistentes e rígidos do corpo humano, é formado por células e material intercelular calcificado. A densidade óssea aumenta até os 30 anos de idade, começando a declinar com o decorrer do tempo, o que acarreta perda da massa óssea, desarranjo da microarquitetura e aumento da fragilidade dos ossos. Processos patológicos, como osteopenia e osteoporose por carência estrogênica, doença de Paget, hipercalcemia, metástases ósseas de neoplasias malignas, hiperparatireoidismo primário e secundário, como também osteogênese imperfeita e osteoporose juvenil idiopática ou induzida por esteroides e perda óssea associada à doença periodontal, ocasionam invasividade dos osteoclastos, diminuição de osso trabecular e consequente perda do tecido ósseo, levando a aumento da velocidade de remodelamento, com a reabsorção excedendo à formação óssea (MILLER; BOWMAN; JEE, 1995; SMITH, 1996; TENENBAUM et al., 2002; COXON; THOMPSON; ROGERS, 2006; RUSSEL et al., 2008). A perda de tecido ósseo ainda pode ocorrer por outros fatores como trauma seguido de fraturas ósseas e procedimentos cirúrgicos (GRANDI, 2007).

Em razão da perda de um tecido, a reação do organismo é substituí-lo por outro que se assemelhe ao máximo ao original; porém, mesmo o organismo apresentando um grande potencial de regeneração, quando a perda é grande, a regeneração nem sempre ocorre de forma adequada. Quando não há reparo completo, o defeito pode implicar em comprometimento da estética e perda parcial ou total da função da estrutura lesada. Essas alterações são especialmente importantes quando acometem o esqueleto craniofacial, pois, além de proteger diversas estruturas nobres, os ossos do crânio e da face contribuem para a composição estética do indivíduo (OLIVEIRA; SICCA; SILVA, 2003; GRANDI, 2007).

Com o intuito de instituir, recuperar e/ou manter volume e qualidade óssea em regiões que perderam suas conformações anatômicas, diversas pesquisas têm procurado desenvolver ou aperfeiçoar novos e promissores materiais biocompatíveis

³ O texto desta tese obedeceu às normas de Informação e documentação – Citações em documentos – Apresentação da ABNT - NBR 10520, de agosto de 2002. Disponível em: <http://www.abnt.org.br/> Acesso em 12.02.2013.

que favoreçam o reparo dos defeitos ósseos. Dentre as vantagens encontradas nos enxertos aloplásticos, heterólogos e xenógenos, podem-se destacar a disponibilidade comercial, ausência de sítio doador do próprio paciente, características de fácil manipulação e conformação da maioria dos materiais, e possibilidade de uma integração física e/ou química do enxerto no meio inserido (SANTOS, 2002). Além disso, têm sido estudados métodos que impeçam a invasão de tecido conjuntivo no defeito e dificultem a formação do osso. O defeito ósseo pode ser reparado pelo processo de cicatrização, o que ocorre quando a ferida repara com tecido diferente na morfologia e função do originalmente perdido ou por regeneração, com formação de tecido idêntico ao original preexistente (FIGUEIREDO, 2000; CARVALHO; BASSI; VIOLIM, 2004).

Muitos são os relatos sobre o sucesso clínico do osso liofilizado, substituto ósseo de origem bovina (xenoenxerto), como carreador da formação óssea, ao tempo em que fornece estrutura de suporte e osteocondução, podendo prover alto conteúdo de cálcio e fósforo que são essenciais à neoformação óssea. O Bio-Oss® é um osso bovino composto por hidroxiapatita (HA) mineral, que apresenta cristalinidade e composição química semelhantes ao osso mineral natural e, do ponto de vista químico e físico, é idêntico ao osso humano, sendo constituído por uma apatita de carbonato de cálcio. Sua natureza porosa serve para aumentar a área de superfície do material, fornecendo substrato para aumentar a angiogênese e servir de arcabouço para a formação de osso. Por isso, tem sido bastante utilizado nas cirurgias periodontais, no tratamento de patologias do complexo maxilofacial, em traumatologia e implantodontia (SICCA; OLIVEIRA; SILVA, 2000; SCHLEGEL; FUCHTNER; SHULTZE-MOSGAU, 2003; ZAMBUZZI et al., 2006; ARAÚJO et al., 2009).

Apesar das várias indicações do Bio-Oss® na Odontologia como aumento ou reconstrução do rebordo alveolar, preenchimento de defeitos intra-ósseos, periodontais, periimplantares, de alvéolos dentários, defeitos associados a regeneração óssea guiada, como também em cirurgias de elevação do seio maxilar, uma das desvantagens do Bio-Oss® é o tempo entre a enxertia e sua integração ao leito receptor, que pode variar de 6 a 10 meses (WALLACE et al., 2005) ou mais, o que estimula a busca de sua associação com outras substâncias que acelerem a neoformação óssea local.

Os bisfosfonatos (BFs) são considerados a classe mais importante de medicamentos utilizados para o tratamento de doenças que envolvem a atividade osteoclástica excessiva. Utilizados desde a década passada devido à sua atividade na prevenção da reabsorção, atuam como reguladores da remodelação óssea descontrolada e proporcionam reequilíbrio no processo de formação e reabsorção óssea, tentando restabelecer uma fisiologia óssea muito próxima da normalidade (CONSOLARO; CONSOLARO, 2008).

Os BFs aumentam a proliferação e maturação dos osteoblastos e inibem sua apoptose, sugerindo que um efeito anabólico mediado pelos osteoblastos poderá ser atribuído aos BFs. A administração sistêmica de BFs associado a enxertos autógenos em defeitos ósseos de ratos estimula a neoformação e suprime a reabsorção óssea (VON KNOCH et al., 2005). Outros estudos vêm sendo realizados com o objetivo de investigar o efeito dos BFs na formação óssea quando adicionado a materiais de enxertos e durante procedimentos regenerativos (HABIBOVIC et al., 2005; JAKOBSEN et al., 2007).

O alendronato de sódio (ALN) é um BF que se encontra disponível no mercado desde 1990. Embora o mecanismo de ação ainda não esteja bem entendido, as observações clínicas e histológicas sugerem um envolvimento de recrutamento, ativação e apoptose dos osteoclastos (LAZAROVICI et al., 2009).

O ALN estimula a formação óssea em enxertos autógenos de ratos, podendo ser empregado como opção terapêutica para estimular a neoformação tecidual em diferentes casos de remodelação óssea (ALTUNDAL; GURSOY, 2005). Pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de avaliar sua ação na redução da reabsorção dentária e de enxertos, bem como na perda óssea alveolar (LEVIN et al., 2001; TOKER et al., 2012). O tratamento prévio de enxertos autógenos com solução local de ALN é um procedimento seguro que, além de proteger contra a reabsorção, não afeta o esqueleto por inteiro, como acontece com a utilização sistêmica (TOKER et al., 2012).

São raros os relatos na literatura sobre a associação do Bio-Oss® com BFs (HOUSHMAND et al., 2007) e não foram encontrados estudos acerca da associação do Bio-Oss® com o ALN utilizados localmente no reparo de defeitos ósseos.

Diante do sucesso clínico do Bio-Oss®, associado à sua capacidade de atuar como transportador de drogas e material osteocondutor, buscando-se reduzir o tempo de osteointegração e partindo-se da premissa de que o ALN apresenta efeito anabólico mediado pelos osteoblastos, o presente estudo avaliou através de radiomicrografia se o ALN a 0,5 e 1%, aplicado localmente e associado ao Bio-Oss®, acelera o reparo de defeitos ósseos confeccionados na calvária de coelhos.



Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo, formado por células e material extracelular calcificado como a matriz óssea. O crescimento do osso tem início durante o período fetal e continua até o final da segunda década de vida (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Este tecido ósseo é distinguido dos demais pela presença de fosfato e cálcio mineral, como a HA $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, principal componente mineral do osso e elemento essencial responsável pela função de apoio mecânico. Devido à sua dinâmica, o tecido ósseo é continuamente desgastado pela atividade osteoclástica e substituído pela atividade osteoblástica, sendo ambas reguladas por fatores sistêmicos e locais (ROBBINS; COTRAN, 2005).

O esqueleto é formado por osso cortical compacto que forma a parte externa das estruturas esqueléticas, representando 80% de todo o esqueleto e o osso esponjoso ou medular que forma a porção interna dos ossos longos, corpos vertebrais e pelve, representando 20% do total do esqueleto humano. Nos estados de deficiência mineral, o osso trabecular é responsável pelo fornecimento do suprimento inicial. O tecido ósseo compacto maduro é composto por cerca de 70% de sais inorgânicos e 30% de matriz orgânica. Mais de 90% do componente orgânico é formado por colágeno, enquanto o restante é constituído por proteoglicanos da substância fundamental e por um grupo de moléculas não colagênicas envolvidas na regulação da mineralização óssea. Apesar de existirem mais de 20 tipos diferentes de colágeno nos vários tecidos, no osso predomina o tipo I. O colágeno é crítico na reparação óssea, facilitando a formação precoce de espículas nas áreas de fraturas (ALLORI; SAILON; WARREN, 2008).

O osso é o único tecido conjuntivo que possui processo organizado de mineralização, medula óssea, canais vasculares, canalículos e lacunas. É um reservatório de cálcio, magnésio, fósforo e outros íons essenciais às funções homeostáticas. Tem como principal função a sustentação do esqueleto. Seu peso consiste em 35% de matriz orgânica, dos quais 95% são representados por

colágeno tipo I e 5% por proteínas não colagenosas (osteonectina, osteocalcina, proteína morfogenética óssea e a sialoproteína óssea). A matriz inorgânica é permeada por cristais de HA, que perfazem os 67% remanescentes do osso. Quando submetido a trauma ou situações patológicas, pode sofrer colapso em sua resistência e ser fraturado (TEN CATE, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A matriz mineralizada forma-se aproximadamente uma semana depois da deposição da matriz orgânica. Dentro de poucas semanas, a mineralização alcança cerca de 70% do seu nível máximo; a partir daí segue lentamente por dois ou três anos. Na menopausa, a média de mineralização diminui, porque o novo tecido ósseo é remodelado novamente antes da completa mineralização (RODAN et al., 2004).

A matriz orgânica extracelular é composta de 90-95% de colágeno, o restante é formado por um meio gelatinoso homogêneo que é denominado de substância fundamental, composta por líquido extracelular acrescido de proteoglicanas. Na mulher, aos 40 anos, a reabsorção começa a exceder a formação óssea em aproximadamente 0,5% ao ano. Nessa fase, a quantidade de osso reabsorvido aumenta agudamente a cada ano, perdendo-se de 1 a 3% de osso cortical e acima de 5% de osso trabecular (MAZESS, 1982).

Histologicamente, o osso pode ser dividido em compacto ou denso e esponjoso ou lacunar ou reticulado. No tecido ósseo esponjoso, os espaços medulares são mais amplos e apresentam várias trabéculas. Já o osso compacto, não lhe constando praticamente espaços medulares, apresenta os canais de Volkmann e de Havers. Aproximadamente um percentual de 15 a 25% do osso trabecular é calcificado e sua estrutura é semelhante a um favo de mel, sendo formado por lâminas horizontais e verticais, que se interconectam, assegurando força mecânica. O osso compacto corresponde a 75% de todo o esqueleto e tem uma média de remodelação anual de 4% (MANALOGAS, 2000; GUYTON; HALL, 2006).

Na fase inicial da vida e de crescimento, a formação excede a reabsorção, motivo pelo qual o osso aumenta rapidamente tanto em tamanho quanto em espessura, ocasionando aumento da massa óssea; na idade adulta, ocorre equilíbrio entre a formação e a reabsorção, a partir dos 30 anos de idade, a reabsorção excede a formação óssea, havendo conseqüentemente, perda gradual da massa

óssea. Enquanto com o envelhecimento, principalmente em mulheres na menopausa, predomina a reabsorção, podendo resultar em baixa densidade óssea mineral. De modo geral, a perda óssea é mais acentuada no osso trabecular do que no osso cortical. Em um indivíduo adulto, o índice de remodelação no osso cortical é de 5% e o osso esponjoso 20% ao ano. A massa óssea é o resultado da quantidade de osso adquirida durante o crescimento, e da perda relacionada com a idade. Depois da fase de reabsorção, os osteoblastos iniciam o processo de formação óssea com a produção de matriz total do osso que dura de 3 a 4 meses (TEN CATE, 2001).

O remodelamento ósseo ocorre durante toda a vida, mesmo após terem cessado o crescimento e modelagem do esqueleto, esse é caracterizado pela formação e reabsorção da matriz óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). No esqueleto humano há de 1 a 3 milhões de pontos de reabsorção com uma taxa de renovação de aproximadamente 0,7% ao ano, ocorrendo uma remodelação quase completa do esqueleto a cada dez anos (MANALOGAS, 2000; ROBBINS; COTRAN, 2005; GUYTON; HALL, 2006). As células envolvidas no remodelamento ósseo são osteócitos, osteoclastos e osteoblastos. Os osteoclastos dão início à reabsorção óssea, os osteoblastos são atraídos para a cavidade de reabsorção, iniciando a formação óssea e os osteócitos são os osteoblastos maduros aprisionados dentro do osso calcificado que posteriormente se mineralizam (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

2.1.1 Células do Tecido Ósseo

As células osteogênicas surgem de células mesenquimais primitivas que estão contidas no estroma do osso medular e a partir de pericitos adjacentes a pequenos vasos sanguíneos que estão presentes no tecido conjuntivo e têm como função a diferenciação de células-tronco osteogênicas. Para que esse processo ocorra, é necessária que haja a estimulação de fatores de crescimento tumoral β (TGF- β – *Transforming growth factor*), proteína óssea morfogenética (BMP-2- *Bone Morphogenetic Protein*), marcadores da diferenciação celular como osteocalcina,

osteonectina, fosfatase alcalina e sialoproteína que também promovem a formação de novos vasos através da secreção do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor*) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os osteoblastos são células ramificadas e jovens, com intensa atividade metabólica, responsáveis pela produção da parte orgânica e mineralização da matriz óssea. São células osteoprogenitoras, originados das células mesenquimais da medula óssea, responsáveis pela síntese e deposição de material proteico à matriz óssea. Sua principal função é a síntese e secreção de proteínas, em especial, o colágeno do tipo I, essenciais à formação e mineralização da matriz óssea. Quando esses são aprisionados nas lacunas da matriz óssea, recebem a denominação de osteócitos, (YOUNG; HEATH, 2000; BREW; FIGUEIREDO, 2003). Em humanos, a vida média é em torno de doze semanas, período durante o qual essa célula deposita entre 0,5 a 1,5 μm de matriz osteóide ao dia (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A sobrevivência dos osteoblastos metabolicamente ativos é de aproximadamente três meses. Após esse período sofrem apoptose e são circundados por uma matriz, transformando-se em osteócitos ou células de revestimento (YOUNG; HEATH, 2000), as quais se localizam ao longo das superfícies ósseas, quando sintetizam, transportam e arrumam as diversas proteínas da matriz óssea, incluindo o colágeno tipo I, proteína óssea extracelular mais abundante. Responsáveis pela mineralização do tecido ósseo ligam-se a diversos hormônios, citocinas, fatores de crescimento e proteínas extracelulares da matriz, através da secreção do VEGF, promovendo a formação de novos vasos sanguíneos, que são fundamentais para neoformação e reparo de defeitos ósseos (AUBIN; TRIFFITT, 2002).

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas e móveis, com 20 a 30 núcleos e 50 a 100 μm de diâmetro. Derivados das células progenitoras hematopoiéticas, dão origem aos monócitos\macrófagos da medula óssea e são responsáveis por reconhecer, degradar e reabsorver a matriz óssea. A atividade osteoclástica é, em geral, maior que a osteoblástica, no tocante ao equilíbrio entre a formação e reabsorção óssea que ocorrem de forma conjugada e determinam a massa esquelética (ROBBINS; COTRAN, 2005). Quando em atividade, repousam sobre a superfície do osso, criam um microambiente fechado e tornam-se

polarizados. Seus prolongamentos, em forma de vilos, com aspecto de borda em escova, secretam hidrogênio (H⁺), colagenases e hidrolases, responsáveis pela dissolução mineral e degradação das proteínas da matriz óssea. Os osteoclastos são vistos em preparos histológicos descalcificados e estão situados em depressões reabsorvidas da superfície óssea, denominadas de lacunas de reabsorção ou de Howship (TEN CATE, 2001, JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A ação conjunta entre osteoblastos e osteoclastos ocorre em múltiplos focos, de forma que a reabsorção em um local é equilibrada pela formação em outro, sem enfraquecimento do esqueleto. Os osteoclastos participam de forma efetiva no processo de remodelação. Por serem altamente móveis, podem migrar ao longo das superfícies ósseas, sendo localizado em áreas a serem reabsorvidas. Nessas áreas, secretam enzimas hidrolíticas que dissolvem o tecido ósseo formando lacunas de reabsorção. Têm a função de limpar a superfície óssea, permitindo o depósito de tecido ósseo pelos osteoblastos (CARVALHO; PONZONI, 2002).

Os osteoclastos apresentam tempo de vida *in vivo* entre duas a quatro semanas e *in vitro*, no máximo duas semanas. Chegam ao local de reabsorção através da circulação sanguínea. Ao entrarem em contato com a superfície a ser reabsorvida, acidificam o microambiente e promovem a dissolução da porção mineral, degradando, dessa forma, tanto o mineral quanto a matriz orgânica (YOUNG; HEATH, 2000; ROBBINS; COTRAN, 2005). Apresentam dobras na membrana celular conhecidas como pregas profundas ou borda em escova. Adjacente a essa borda, aparece uma área citoplasmática, denominada zona clara, que permite ao osteoclasto fixar-se à superfície óssea e manter um microambiente com pH ácido, favorável à reabsorção óssea (VÄÄNÄNEN; ZHAO, 2002).

O tráfego vesicular dos osteoclastos é responsável pela concentração e transporte de enzimas envolvidas na reabsorção óssea. Na região da borda em escova dos osteoclastos ocorre a desmineralização sequencial de colágeno e dissolução de matriz colágena, necessários para que haja a reabsorção óssea (MULINARI; VAARANIEMI; VAARANIEMI, 2003). A borda em escova cria um compartimento acidificado entre a célula e a superfície óssea, ocasionando a remoção da parte mineral do osso, e conseqüentemente, degradação do colágeno por enzimas. Com a inibição do tráfego vesicular e da membrana da borda em

escova, conseqüentemente, as atividades específicas de facilitar a reabsorção óssea são também reduzidas (WOO; HELLSTEIN; KALMAR, 2006).

Os osteócitos são células elípticas, menores que os osteoblastos, com baixa atividade metabólica que estão regularmente espaçados ao longo da matriz mineralizada e se comunicam entre si e com os osteoblastos da superfície óssea por meio de diversas extensões da sua membrana plasmática. São essenciais à manutenção da integridade da matriz óssea e correspondem aos osteoblastos que foram aprisionados nas lacunas da matriz óssea mineralizada. No interior dos canalículos ósseos, apresentam diversos prolongamentos citoplasmáticos que têm como função estabelecer junções entre as células, mantendo as trocas de mineral na matriz óssea, bem como servir de transdutores de cargas mecânicas no osso (MANALOGAS, 2000; YOUNG; HEATH, 2000).

Das células osteoprogenitoras, os osteócitos são os mais numerosos, seu número é dez vezes superior ao dos osteoblastos. São células maduras responsáveis pela manutenção do tecido ósseo, através da nutrição das trabéculas ósseas, apresentam baixa atividade metabólica, poucas organelas de síntese, núcleo achatado e morfologia obedecendo à forma da lacuna óssea (BREW; FIGUEIREDO, 2003).

2.2 REPARO ÓSSEO

O osso é um dos tecidos mais resistentes e rígidos do corpo humano, composto metabolicamente por células ativas que estão integradas em uma estrutura rígida. Após sofrer algum trauma, apresenta grande potencial de regeneração da forma e função. O reparo ósseo é uma resposta natural do corpo à injúria. Quando o tecido ósseo é lesado, numerosos vasos sanguíneos são rompidos, ocasionando extravasamento de sangue, com formação do coágulo sanguíneo que gera uma rede de fibrina cuja função é selar o defeito e promover a chegada de células inflamatórias e fibroblastos, preparando o local para que novo tecido seja formado (ROBBINS; COTRAN, 2005).

Na fase inflamatória, inicia-se o processo de reparo ósseo. Também chamada de fase exsudativa ou defensiva, caracteriza-se pelo processo inflamatório local. Um trauma no tecido ósseo provoca o rompimento de numerosos vasos sanguíneos, com consequente hemorragia e acúmulo de hematoma dentro do canal medular. A região no início do processo é suprida com oxigênio proveniente do osso esponjoso e dos músculos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Devido à hemostasia, há interrupção da circulação, ocasionando a morte de células osteogênicas e endoteliais dos capilares, como também dos osteócitos que circundam os canais de Havers. A circulação sanguínea retorna a partir de vasos obliterados danificados que se anastomosam com partes intactas de outros vasos. O efeito do dano vascular é muito importante para o processo de reparo ósseo, visto que o material necrótico provoca uma imediata e intensa resposta inflamatória aguda que resulta em vasodilatação generalizada e exsudação plasmática. Dessa forma, células inflamatórias como leucócitos polimorfonucleares, seguidos por macrófagos, migram para a região, com o objetivo de através da digestão intra e extracelular, remover o coágulo e o tecido necrótico (CARVALHO; PONZONI, 2002).

Através do processo de fagocitose, o coágulo e os osteócitos mortos são removidos das regiões necrosadas, dando início à fase reparadora (CARVALHO; PONZONI, 2002). A destruição do tecido necrótico, associada a uma intensa proliferação celular e formação de vasos, ocasiona a formação do tecido de granulação. As células indiferenciadas e jovens do tecido de granulação se diferenciam em células ósseas maduras, que produzem matriz extracelular que será mineralizada. Em seguida, esse vai se tornando mais fibroso, e células mesenquimais se diferenciam em condroblastos e progressivamente substituem o tecido de granulação fibroso por cartilagem hialina, com formação do calo provisório, sendo esse constituído por tecido fibroso, cartilagem e tecido ósseo imaturo. Ao mesmo tempo, o perióstio e o endóstio, próximos à área lesada, respondem com uma intensa proliferação, formando um tecido muito rico em células osteoprogenitoras. Essas são ativadas e depositam uma malha de tecido ósseo entrelaçado dentro e em torno do calo provisório (GUYTON; HALL, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008), o qual é reforçado pelo depósito de sais de cálcio na matriz cartilaginosa, transformando-se em calo ósseo.

As prostaglandinas e outras citocinas liberadas ativam as células osteoprogenitoras no periósteo, cavidade medular e tecidos moles circundantes, estimulando a produção de osteoblastos, células tronco, localizadas no tecido superficial de revestimento ósseo. Nessa fase, surge um grande número de fibroblastos produtores de colágeno tipo III que são responsáveis pela formação do calo fibroso; dessa forma, a região lesionada é envolvida por fibras colágenas. As células osteoprogenitoras como os osteoblastos e osteócitos, irão depositar trabécula subperiostal de osso trançado que se orienta perpendicularmente ao eixo cortical e dentro da cavidade medular (CARVALHO; PONZONI, 2002; ROBBINS, COTRAN, 2005).

Fatores de crescimento derivados de plaquetas têm efeitos mitogênicos para fibroblastos e para células ósseas, além disso, TGF- β promovem a formação de colágeno tipo I, que desempenha papel básico no processo de mineralização, favorecendo a disposição dos cristais. Dentro de 6 a 12 horas, cerca de 60 a 70% da matriz óssea sofre mineralização primária, no entanto a mineralização secundária ocorre de forma mais lenta, estando completa depois de um ou dois meses (CARVALHO; PONZONI, 2002).

O calo ósseo imaturo é mais celular e menos mineralizado. Após a formação do calo ósseo, dá-se à fase de remodelamento, a qual ocorre lentamente, durante meses a anos, formando-se o tecido ósseo lamelar maduro (GUYTON; HALL, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Nessa fase, o calo passa por processos de reabsorção e neoformação, até adquirir o formato e perfil de osso maduro (ROBBINS; COTRAN, 2005; GUYTON; HALL, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Quando o osso é submetido a estresse, ocorre eletropositividade na superfície convexa (atividade osteoclástica) e eletronegatividade na superfície côncava (atividade osteoblástica). Com um tempo de três a seis meses para obter resistência, o osso cortical, altamente organizado e mecanicamente forte, substitui o osso desorganizado (ROBBINS; COTRAN, 2005).

Defeitos ósseos de pequenas dimensões reparam-se sem formação de cicatriz fibrosa, quando as células lesadas são substituídas por outras de morfologia e função iguais às anteriores. Dessa forma, o reparo ocorre por regeneração, e o mecanismo reparador é semelhante ao da osteogênese embriológica. Nos defeitos

de maiores extensões (críticos), o reparo acontece de forma diferente, com formação de cicatriz (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; SEAL; OTERO; PANITCH, 2001; CARVALHO; BASSI; VIOLIN, 2004).

O padrão e o tempo de reparo podem variar de acordo com a espécie animal e a localização anatômica. Devido à grande área de inserções musculares, o suprimento sanguíneo da calvária de humanos é inferior ao de animais, razão pela qual animais experimentais apresentam capacidade de regeneração de defeitos na calvária melhor do que em humanos. Como resultado, pequenos defeitos na calvária de humanos adultos não se reparam espontaneamente (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

O coelho apresenta metabolismo três a quatro vezes mais rápido do que o ser humano. Assim sendo, a maior parte do remodelamento osteogênico em coelhos irá ocorrer entre as primeiras seis e oito semanas pós-cirurgia, sendo considerados 60 dias, um período ideal para avaliar a formação óssea em coelhos, enquanto é necessário um período de cerca de 180 dias em humanos (VASCONCELOS; PETRILLI; PALECKIS, 2006).

2.3 BISFOSFONATOS

Apesar de a primeira síntese dos BFs ter ocorrido na metade do século XIX, em 1865, na Alemanha, o conhecimento sobre suas características biológicas tem maior número de registros na década de 60, com a aplicação desses componentes na indústria. Há cerca de 40 anos vem sendo empregado em seres humanos (FLEISCH, 1998; VASIKARAN, 2001). São análogos sintéticos do pirofosfato (P-O-P), produto normal do metabolismo humano e reguladores fisiológicos da calcificação e reabsorção óssea, estando presentes naturalmente no soro e na urina. Quando administrados oralmente, o pirofosfato e os polifosfatos são incapazes de inibir a calcificação ectópica *in vivo*, devido à sua hidrólise no trato gastrointestinal. A ação dos BFs deve-se à sua semelhança estrutural com esse grupo de compostos que, ao sofrerem modificação na estrutura, dão origem a diferentes gerações de BFs com diferentes níveis de atividade (TENENBAUM et al., 2002).

Quimicamente são constituídos por um átomo central de carbono ligado a dois átomos de fosfato (P-C-P), possuindo duas cadeias laterais (R1 e R2). Alterações na cadeia R1 ocasionam maior ou menor afinidade do medicamento pela HA do osso, ao tempo em que as alterações na cadeia R2 irão interferir na potência do fármaco. A modificação mais relevante foi a adição de nitrogênio ou de um grupo amina na cadeia R2, o que ocasionou um importante aumento na potência dos BFs. Podem ser classificados, de acordo com a sua potência, em de primeira, segunda ou terceira geração, ou ainda, de acordo com a presença do nitrogênio, em nitrogenados ou não nitrogenados. Por possuírem ligações estáveis P-C-P, ao invés de lábeis P-O-P, apresentam as propriedades antidesmineralizantes do pirofosfato, porém são resistentes à hidrólise enzimática (ROGERS et al., 2000).

Os BFs de primeira geração incluem o etidronato, o clodronato e o tiludronato, já os de segunda são os aminobisfosfonatos, como o ALN e o pamidronato, enquanto a terceira geração possui uma cadeia cíclica, sendo seus representantes o risedronato e o zoledronato (Figura 01). As propriedades antirreabsortivas dos BFs aumentam, aproximadamente dez vezes entre as gerações da droga, a ligação de BFs aos minerais do tecido ósseo leva à supressão da reabsorção induzida por osteoclastos. O etidronato foi o primeiro BFs sintetizado com objetivo de ser utilizado como aditivo em detergentes, porém foram observados efeitos fisiológicos, como capacidade de inibição da reabsorção óssea. A partir daí, novas pesquisas foram realizadas, com objetivo de descobrir outros BFs (FLEISCH, 1998; DRAKE; CLARKE; KHOSLA, 2008).

O sucesso clínico do etidronato e do clodronato nos anos 70 e 80 motivou alterações na cadeia R2 e um átomo de amino-nitrogênio foi incluído na cadeia alquil dos BFs, com finalidade de aumentar a potência e a capacidade desses medicamentos interferirem no metabolismo ósseo, reduzindo, conseqüentemente, a reabsorção óssea. A partir dessas e de outras modificações, surgiram outros BFs com potência maior (EBETINO et al., 1996).

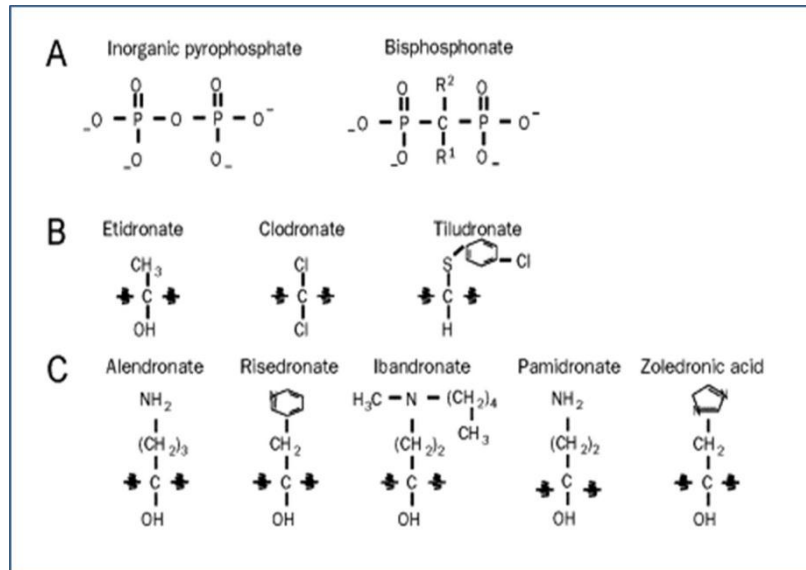


Fig. 01 A, B e C: Estrutura química do pirofosfato e de diferentes bisfosfonatos.

Fonte: Adaptado de Drake, Clarke e Khosla, 2008.

Por constituírem um grupo de medicamentos antirreabsortivos, os BFs são amplamente utilizados no tratamento de doenças metabólicas como osteoporose, Doença de Paget, hipercalcemia, metástases ósseas de neoplasias malignas, hiperparatireoidismo primário e secundário. Também são utilizados em crianças com osteogênese imperfeita e osteoporose juvenil idiopática ou induzida por esteróides, e ainda na redução da perda óssea associada à doença periodontal (TENENBAUM et al., 2002; COXON; THOMPSON; ROGERS, 2006; RUSSEL et al., 2008). Em alguns processos patológicos, como osteopenia e osteoporose por carência estrogênica, atuam como reguladores da remodelação óssea descontrolada, proporcionando reequilíbrio no processo de formação e reabsorção óssea, sendo essenciais na manutenção dos ossos, buscando restabelecer uma fisiologia óssea muito próxima da normalidade (CONSOLARO; CONSOLARO, 2008).

Após administrados, os BFs são rapidamente removidos da corrente sanguínea. Cerca de 50% acumula-se em locais de mineralização óssea, permanecendo nesses locais por meses ou anos, até que ocorra a reabsorção. Sua meia vida é de mais de 10 anos e está relacionada com o tempo de *turnover* do sítio esquelético (LIN et al., 1991; GANGULI et al., 2002). Em locais de reabsorção óssea, ligam-se à HA do osso exposto e sua atividade é iniciada quando o osteoclasto gera um pH ácido e dissolve a matriz inorgânica, liberando o BF que está ligado à HA (SATO et al., 1991; PORRAS; HOLLAND; GERTZ, 1999).

As moléculas dos BFs passam a fazer parte da estrutura óssea quando elas são incorporadas à matriz do osso, sendo depois reabsorvidas, durante a remodelação natural do esqueleto. Dessa forma, quando são ligados ao tecido ósseo, só serão liberados quando esse sofre reabsorção (LIN, 1996). São resistentes à degradação enzimática (LICATA, 1997). A inibição da precipitação do fosfato de cálcio ocasionada pelos BFs retarda a transformação da fase amorfa para a fase cristalina da HA, a agregação de cristais de HA e a inibição da sua dissolução (RUSSEL, 2008).

Os BFs são bem tolerados tanto por via oral quanto intravenosa. No entanto, quando administrados por via oral, são pouco absorvidos e sofrem interferência da alimentação. Apresentam alguns efeitos adversos, quando ingeridos por via oral, dos quais são mais frequentes, a cefaleia, a dispepsia, a diarreia e a constipação intestinal. Embora rara, a esofagite corrosiva também pode ocorrer. Por via intravenosa, podem causar elevação da temperatura, síndrome gripal, hipocalcemia e hipofosfatemia transitórias (BARRIOS-GONZÁLEZ; GARCÍA-NIETO, 2005). Úlcera gástrica e estenose do esôfago também foram relatadas (PONTE-FERNÁNDEZ; ESTEFANIA-FRESCO; AGUIRRE-URIZAR, 2006). São muitos os relatos de osteonecrose dos maxilares decorrente do uso prolongado de BFs por via sistêmica (MAAHS, 2008).

Após administração por via oral, são rapidamente removidos do plasma pela excreção renal ou pela rápida captação pelo tecido ósseo. A rápida remoção do plasma e a ligação específica do BF à HA geram quase uma ausência de efeitos tóxicos sistêmicos (LIN et al., 1991; GANGULI et al., 2002).

Os BFs administrados localmente são eficazes e têm como vantagem evitar os efeitos colaterais da administração sistêmica, pois são absorvidos em um local específico, apresentando pouca ou nenhuma absorção sistêmica. Além disso, a concentração local obtida pode ser muito maior do que através da via sistêmica (FRINKLEMAN, 1998).

2.3.1 Mecanismo de ação dos bisfosfonatos

O verdadeiro mecanismo de ação dos BFs ainda não está esclarecido. Alguns mecanismos de ação têm sido propostos. Inicialmente acreditava-se que a ligação dos BFs à HA resultava em inibição de sua solubilidade (SATO et al., 1991).

Após serem absorvidos, os BFs são rapidamente retirados da circulação sistêmica e local, ficando aderidos à superfície do osso, principalmente nos locais de atividade osteoclástica (LIN, 1996); quando ativos, tornam o microambiente ácido, facilitando a liberação do BF da superfície óssea e levando a uma alta concentração local (ROGERS et al., 2000).

Tem sido sugerido um mecanismo que se inicia com a liberação do BF ligado à HA, devido à acidificação produzida durante o início do processo de reabsorção. Nessa situação, o BF liberado deve atingir uma concentração entre 0,1 e 1,0 Mm na região da zona clara, o que permite aumentar a permeabilidade iônica da borda rugosa dos osteoclastos, destruindo-a e conseqüentemente cessando a reabsorção (SATO et al., 1991). O mecanismo pelo qual os BFs inibem os osteoclastos ainda é discutível. Tem sido relatado que pode ocorrer devido às alterações na borda rugosa do osteoclasto ou a inibição da atividade osteoclástica pode ser um efeito secundário de uma ação do osteoblasto, levando à produção de um fator de recrutamento e à sobrevivência de osteoclastos (FOGELMAN et al., 1996).

Os BFs apresentam alta afinidade pelo cálcio do esqueleto, acumulam-se no tecido ósseo. A fração acumulada ativa é apenas aquela que está na superfície óssea. Outros mecanismos como citotoxicidade ou injúria metabólica nos osteoclastos maduros, inibição da ligação do osteoclasto ao osso, inibição da diferenciação, recrutamento e interferências nas propriedades estruturais dos osteoclastos têm sido propostos (SATO et al., 1991). Portanto, os BFs inativam os osteoclastos, que entram em apoptose, reduzindo a reabsorção óssea, e conseqüentemente o *turnover* ósseo, diminuem o balanço ósseo positivo (SILVERMAN; MARACIC, 2007), aumentam a massa óssea e reduzem o risco de fraturas em mulheres com osteoporose pós-menopausa (BROULIK et al., 2005).

Outra teoria é que, após ser absorvido, o BF fica retido no osso na forma inativa, sendo liberado localmente durante o processo de reabsorção óssea, agindo preferencialmente sobre os osteoclastos. O mecanismo envolvido é a inibição da atividade osteoclástica, como recrutamento dos osteoclastos, diminuição da aderência dessas células na matriz mineralizada e diminuição na diferenciação e no tempo de vida celular e no número desses, com consequente indução a apoptose celular. Esse mecanismo ocorre devido à ação direta do medicamento sobre a célula, causando alterações morfológicas celulares, como modificações no citoesqueleto e na borda em escova (SPARIDANS; TWISS; TALBOT, 1998).

Foi proposto que a queda da geração de novas unidades de remodelação óssea e consequente redução no *turnover* ósseo, leva à diminuição da ação dos osteoclastos, ocasionada pela ação dos BFs. Por outro lado, foi demonstrado em animais e humanos, aumento na quantidade de osso neoformado, devido à diminuição no *turnover* ósseo que pode aumentar o depósito mineral nos ossos, pois o osso neoformado terá menos chance de ser remodelado e irá, portanto, exigir maior tempo para completar a mineralização. Cerca de 70% da mineralização do osso neoformado ocorre dentro das primeiras semanas, mas o enriquecimento mineral continua por longo tempo (RODAN; FLEISCH, 1996; MANOLAGAS, 2000).

Os BFs nitrogenados e não nitrogenados causam apoptose de osteoclastos de coelhos. A apoptose dos osteoclastos está envolvida em trocas morfológicas, perda da membrana mitocondrial e na ativação de proteases caspase-3, com possibilidades de clivar substratos peptídicos (BENFORD et al., 2001).

O mecanismo molecular de ação dos BFs depende da presença do átomo de nitrogênio na cadeia da molécula. Os BFs atuam causando efeito tóxico nos osteoclastos ou interferindo na sua via específica. Os não-nitrogenados são convertidos intracelularmente em análogos não hidrolizáveis de ATP (Adenosina trifosfato), os quais são tóxicos para as células. Os nitrogenados inibem a farnesil pirofosfatase sintetase (FPPS), que é uma enzima da via do mevolonato, resultando na inibição da síntese de isoprenóides geranylgeranyl pirofosfatase (GGPP), na prenilação de pequenas GTPs (Guanosina trifosfato), proteínas de ligação, como Ras e Rho que são responsáveis pela integridade do citoesqueleto e da sinalização intracelular. A inibição da FPPS também faz com que a acumulação de isoprenóide

difosfato (IPP), que está incorporada Apppl (um análogo de ATP capaz de induzir apoptose dos osteoclastos). Após a infusão intravenosa, a captação transitória de BPs nitrogenados por monócitos provoca acúmulo de IPP, que ativa γ , δ -T células e desencadeia a fase aguda da reação (RUSSEL; ROGERS, 1999; RUSSEL et al., 2008) (Figura 02).

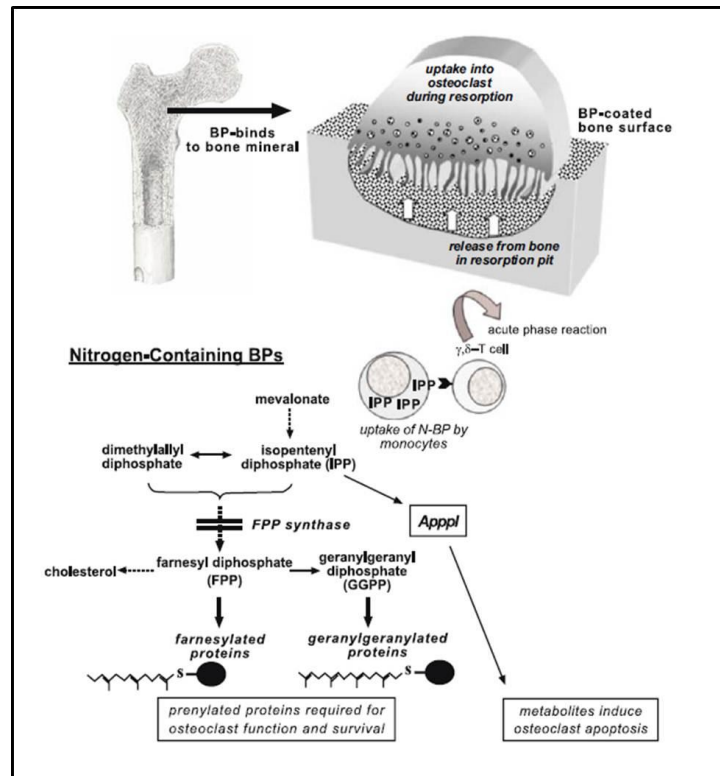


Fig. 02 – Mecanismo de ação molecular dos bisfosfonatos.
Fonte: Modificado de Russel et al., 2008.

A consequência desses eventos é a supressão da atividade osteoclástica, havendo uma perda da integridade do citoesqueleto, enquanto os osteoclastos tornam-se inativos, ocorrendo a apoptose. Acredita-se que a inibição direta da atividade dos osteoclastos ocorre devido ao desaparecimento da borda ondulada, que é a membrana convoluta dos osteoclastos, sendo essa uma forte indicação da inativação dos osteoclastos por BFs *in vivo* (HALASY-NAGY; RODAN; RESZKA, 2001; BOIVING; MEUNIER, 2002; VAN BEEK; LOWIK; PAPALLOUS, 2002)

Os BFs modificam a remodelação óssea através da ação direta sobre os osteoclastos ou por meio de fatores liberados pelos osteoblastos, os quais inibem a

função dos osteoclastos. Além da ação sobre o osteoclasto, tem sido demonstrado que esses medicamentos podem aumentar a proliferação e maturação de osteoblastos e inibir a sua apoptose, sugerindo que um efeito anabólico mediado pelos osteoblastos pode ser atribuído aos BPs. Os dados sugerem que o efeito do ALN na atividade osteoblástica pode ser mais importante para o aumento na formação do osso durante a cura dos defeitos do que sua atividade nos osteoclastos (TENENBAUM et al., 2002).

O exato mecanismo de ação não está bem esclarecido, porém as observações clínicas e histológicas sugerem um envolvimento de recrutamento, ativação e apoptose dos osteoclastos. Outras teorias se baseiam na natureza antiangiogênica dessas drogas, que se expressa pela interferência na proliferação das células endoteliais (LAZAROVIT et al., 2009).

2.3.2 Alendronato de Sódio

O ALN é um composto aminobifosfonado, derivado do ácido alendrônico (4-amino-1-hidroxibutano bisfofonato de sódio); é um potente inibidor da reabsorção óssea, sendo seis a dez vezes mais potente que o pamidronato e mil vezes que o etidronato, no entanto, é utilizado em concentrações mais baixas que o etidronato e o clodronato. É o BF mais empregado para o tratamento da osteoporose, com sua estrutura química análoga ao pirofosfato, inibe a reabsorção óssea, sem, inibir de forma acentuada, a mineralização. Apresenta grande afinidade com a matriz óssea, de tal forma que cerca de 50% da droga absorvida permanece fixa no osso. Apresenta meia vida longa, podendo permanecer no osso de ratos por aproximadamente 200 dias, em cães por mais de três anos e acima de 10 anos em humanos (KANIS et al., 1995; GANGULI et al., 2002; VEENA; PRASAD, 2010).

Fabricado como sal monossódico do ácido alendrônico ($C_4H_{13}NO_7P_2$), encontra-se frequentemente na forma triidratada ($C_4H_{12}NNaO_7P_2 \cdot 3H_2O$). Apresenta-se como pó fino e branco, possuindo comportamento anfótero e característica ácida (dois grupos fosfóricos) e básica (grupo amina), com faixa de fusão entre 257 e 262°C (KIECZYKOWSKI et al., 1995). Uma massa de 1mg do ácido alendrônico apresenta peso molecular de 249,10 e corresponde a aproximadamente 1,306 mg

de ALN triidratado, de peso molecular 325,12g/l. O grupo amina na cadeia lateral aumenta a potência na inibição da reabsorção óssea (PARFITT, 1999).

Ao ser depositado em locais de remodelação óssea, o ALN atua diretamente no osteoclasto ou pode ser incorporado na matriz do tecido ósseo. Quando isso ocorre, não é farmacologicamente ativo, até que ocorra a remodelação óssea, o mesmo passa a interagir novamente com os osteoclastos (PORRAS; HOLLAND; GERTZ, 1999).

O ALN começou a ser utilizado em 1990 para o tratamento da osteoporose em pacientes de alto risco, tendo sido posteriormente aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da osteoporose pós-menopausa. É também utilizado para pacientes do sexo masculino com osteoporose, doença de Paget, osteodistrofia renal e outras doenças em que a redução da atividade dos osteoclastos torna-se desagradável (LASSETER et al., 2005; ASSAEL, 2009).

No mercado brasileiro, o primeiro medicamento contendo ALN foi lançado pela Merck Sharp e Dohme (Fosamax® - comprimidos de 10 e 70mg), tendo sido aprovado pelo FDA para comercialização e uso em 1995 (McCARTHY, 1995). Em 2004, foi registrado o primeiro medicamento genérico fabricado pela empresa Biossintética (comprimidos de 10mg), o qual se apresenta também sob a forma de solução oral e de cápsulas de gelatina mole, podendo ser manipulado em farmácias magistrais, sob a forma de gelatina dura (IM; QURESHI; KENNEY, 2004). A ação primária do ALN é a inibição da reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos e alguns estudos têm demonstrado que esses medicamentos também interagem com os osteoblastos (REINHOLZ et al., 2000; FROMIGUE; BODY, 2002; IM; QURESHI; KENNEY, 2004).

O efeito do ALN sobre os osteoblastos é dependente de sua concentração. Garcia-Moreno et al. (1998) investigaram, por meio de estudo *in vitro*, a viabilidade dos osteoblastos humanos, a síntese do colágeno e a capacidade de mineralização de osteoblastos, expostos ao ALN nas concentrações de 10^{-1} a 10^{-12} mol/L adicionados ao meio de cultura. Os resultados demonstraram que as concentrações entre 10^{-5} e 10^{-12} mol/L não desempenharam capacidade proliferativa celular. Nas concentrações igual ou maior que 10^{-4} mol/L, a viabilidade osteoblástica foi afetada. A síntese de colágeno diminuiu após a incubação com ALN, entretanto nenhum

efeito foi observado sobre o depósito de cálcio por osteoblastos na concentração igual ou menor que 10^{-5} mol/L.

Diferentes concentrações de ALN (0,5; 1; 5; 10; 20 e 40mg/ml) também foram testadas por Gomes (2006) para avaliar sua citotoxicidade *in vitro* sobre os osteoblastos em cultura celular. A análise da atividade mitocondrial das células demonstrou que a adição de ALN aos osteoblastos em cultura, diminuiu a viabilidade celular em mais de 60% em relação ao controle (sem ALN) em todos os tempos experimentais (0, 24, 48 e 72 horas). A citotoxicidade foi diretamente proporcional à concentração utilizada e as células permaneceram viáveis quando as concentrações foram inferiores a 5mg/ml. O ALN nas seis concentrações estudadas foi citotóxico aos osteoblastos e seguiram uma tendência dose dependente, quanto maior a dose, menor a viabilidade celular.

A citotoxicidade da pasta de ALN em polietilenoglicocol (2mg/ml) foi examinada em cultura de células endoteliais (*in vitro*) e em tecido subcutâneo (*in vivo*) por Moreira et al. (2005), visando à sua aplicação em reimplante dentário. A percentagem de viabilidade celular das culturas foi obtida 0, 6 e 12 horas após o contato das células com a substância. Os resultados revelaram que a pasta de ALN em polietilenoglicocol mostrou-se altamente citotóxica, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Houve diminuição estatisticamente significativa na viabilidade celular em 6 e 12 horas.

Naidu et al. (2008) avaliaram a viabilidade e a função dos osteoblastos de ratos primitivos cultivados em meio de cultura contendo concentrações crescentes de ALN (10^{-3} mol/L; 10^{-4} mol/L; 10^{-5} mol/L; 10^{-6} mol/L) ou zolendronato (3 μ mol/L; 10 μ mol/L; 60 μ mol/L e 100 μ mol/L) em comparação com o grupo controle (500 μ L de meio de cultura sem BFs). Altas concentrações das drogas diminuíram significativamente a viabilidade celular e foram citotóxicas. No entanto, quando o medicamento foi utilizado em baixas concentrações, houve benefícios terapêuticos, sem apresentar efeito citotóxico. A viabilidade celular foi significativamente maior no grupo controle em relação ao experimental em todos os tempos avaliados.

Giuliani et al. (1998) investigaram o efeito do etidronato e do ALN na formação precoce e tardia de células progenitoras de osteoblastos. Medidas do número de unidades formadoras de colônias para fibroblasto precoce e de unidades

formadoras de colônias para osteoblastos tardios em cultura de medula óssea de camundongos e humana foram efetuadas. Um mês após o tratamento, os animais foram sacrificados e os resultados demonstraram que os BFs, em doses relativamente baixas, exerceram influência benéfica nas células da linhagem dos osteoblastos em medula de camundongos e humanos, com efeito, potencialmente positivo nas células da linhagem osteoblástica.

A partir de um estudo de boca dividida, com objetivo de avaliar o efeito local (0,15; 0,75 e 1,5 mg/ml) e sistêmico (0,5mg/kg) do ALN por via endovenosa, na reabsorção óssea alveolar, Yaffe et al. (1995) confeccionaram um retalho de espessura total em mandíbula de ratos. O ALN local foi aplicado através de esponjas embebidas nas diferentes concentrações da substância, durante 10 segundos. No lado controle, foi utilizada solução salina. A partir dos resultados, obtidos por radiomicrografia de alta resolução, foi concluído que não houve diferença estatisticamente significativa na inibição da reabsorção óssea entre o grupo controle e o testado, quando da aplicação local do ALN, enquanto que a administração sistêmica reduziu significativamente a reabsorção óssea.

Em 1997, Yaffe et al. avaliaram o efeito do ALN embebido em esponja de gelatina em concentração mais elevada (20mg/ml) aplicado topicamente sobre o osso exposto, após a elevação de retalho mucoperiosteal. O ALN liberado localmente reduziu de forma estatisticamente significativa a reabsorção óssea.

A eficácia da absorção do ALN pelo osso foi avaliada por Yaffe et al. (1999), por meio de estudo em ratos submetidos à cirurgia para deslocamento de retalho mucoperiosteal. Esponja de gelatina embebida em 10 μ L de ALN foi colocada no osso exposto na região de pré-molares e molares, em ambos os lados da mandíbula. Foi demonstrado que os níveis de ALN estavam mais elevados no local da cirurgia e que a absorção pelo osso alveolar no lado experimental e no sítio cirúrgico foi de aproximadamente 10% da dose; enquanto, no lado contralateral, a absorção foi 20 a 30% do total absorvido no lado experimental. A droga foi detectada no osso da tíbia e no tecido mole e ósseo do lado contralateral, indicando que houve absorção sistêmica. Os autores concluíram que a aplicação local de ALN é uma modalidade importante de tratamento das reabsorções ósseas.

Com o objetivo de investigar se o ALN é efetivo na fase de formação ou reabsorção óssea, Yaffe et al. (2003a) removeram osso medular fresco de 64 ratos jovens, colocaram em cilindro de fêmur desmineralizado e implantaram no tecido subcutâneo de outros animais. O grupo A1 recebeu injeção endovenosa (EV) de 100 μ L de 1,5 mg/ml de solução de ALN por 1, 2 e 3 semanas, enquanto o grupo A2 foi submetido ao mesmo procedimento por 3, 4 e 5 semanas. Após esse período, os animais foram sacrificados e a radiomicrografia de alta resolução para análise dos cilindros foi efetuada até no máximo 24 horas após a fixação. A partir dos resultados obtidos através da radiomicrografia e da histologia, o ALN mostrou-se efetivo na inibição da reabsorção óssea, no entanto não aumentou a quantidade ou densidade do osso durante a fase da formação óssea.

Yaffe et al. (2003b) avaliaram a eficácia da aplicação local do ALN e sua associação com as tetraciclina, na redução da perda óssea alveolar. Os animais (n=86) foram distribuídos em: grupo A (ALN-20mg/ml - 10 μ L); grupo B (tetraciclina 1% - 10 μ L); grupo C (ALN + tetraciclina); grupo D (doxiciclina 10%) e grupo E (ALN+doxiciclina - 10 μ L), tendo sido aplicada solução salina no lado contralateral (controle). Por meio de fotorradiomicrografia, observou-se que a doxiciclina foi mais eficiente que o ALN na redução da perda óssea, a tetraciclina separadamente não reduziu a perda óssea de forma significativa, no entanto quando associada ao ALN reduziu significativamente a perda óssea severa.

Binderman, Adut e Yaffe (2000) avaliaram a efetividade local e a distância de diferentes concentrações de ALN, por meio de análise por radiomicrografia. Cento e vinte e oito ratos foram distribuídos em grupo A (n=60) que recebeu o ALN nas concentrações de 10, 50, 200 e 400 μ g, diluídos em 10 μ L de solução salina; e grupo B (n=68) que recebeu o ALN nas concentrações 0, 50, 200 ou 400 μ g, tendo a droga sido colocada na submucosa da bochecha, em uma região distante e do lado oposto. No lado esquerdo da mandíbula, foi colocado esponja de gelatina embebida em solução salina (controle). Após 21 dias, os animais foram sacrificados e os resultados demonstraram que as concentrações de 200 e 400 μ g, utilizadas topicamente e distante do sítio da cirurgia, respectivamente, reduziram de forma significativa a perda óssea alveolar e foi demonstrado que a efetividade da aplicação tópica do ALN tem uma relação direta com a dose.

Com o propósito de investigar a ação dos BFs na formação óssea, Iwata et al. (2006) testaram em ratos adultos, o efeito do risedronato (0,05; 0,5 e 5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$) ou do ALN (0,1; 1,0 e 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$), durante 17 dias e por via subcutânea, em comparação com um grupo que recebeu solução salina. Através da histomorfometria demonstrou-se que ambos os medicamentos e doses ocasionaram redução estatisticamente significativa na taxa de aposição óssea mineral. Os autores concluíram que os BFs nas doses utilizadas suprimiram significativamente a formação óssea e apresentaram efeito direto na atividade osteoblástica, com supressão da formação óssea, independentemente da reabsorção óssea.

Machado et al. (2006) analisaram a ação do ALD no reparo de defeitos ósseos confeccionados na tíbia de 36 ratos fêmeas ovariectomizados. Os animais foram divididos em grupo controle (água de beber) e ALN (0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg de 0,75 mg/kg), utilizados por um período de 3, 7 e 14 dias. Após esse período, os animais foram sacrificados e, através da análise histológica observou-se que o ALN nos períodos de sete e quatorze dias promoveu formação de grande quantidade de osso e os melhores resultados foram obtidos com a concentração de 0,5 mg/kg. Os autores concluíram que a ação do ALN no reparo ósseo é dose dependente.

Omi et al. (2007) investigaram se o ALN injetado localmente e em baixas doses aumentaria a formação óssea em coelhos submetidos à distração osteogênicas e qual seu efeito sistêmico após aplicação local. Quarenta e sete coelhos foram divididos em sete grupos: solução salina sistêmica (0,2 ml); ALN 0,75 $\mu\text{g}/\text{kg}$; ALN 7,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; ALN 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$, administrados sistemicamente. Os outros grupos receberam solução salina 0,2ml; ALN 0,75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e ALD 7,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ localmente. Após o período de consolidação de 4 semanas, os animais foram sacrificados e submetidos a exames radiográfico e de tomografia computadorizada e testes mecânicos. O ALN administrado localmente e em baixas doses aumentou significativamente a densidade óssea mineral, sem apresentar efeitos adversos no crescimento ósseo.

Abbaspour et al. (2009) também investigaram o efeito do ALN durante a distração osteogênica. Sessenta e seis coelhos foram divididos em grupo experimental, os quais receberam no início da consolidação óssea ALN (7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$) infundido diretamente no segmento alongado por um período de 14 dias, enquanto

no grupo controle foi infundida solução salina. Os animais foram sacrificados após quatro, seis e oito semanas, tendo sido examinadas a densidade óssea mineral e a espessura do osso cortical através de tomografia quantitativa computadorizada periférica, enquanto o alongamento da tíbia foi medido através do teste de flexão. Os resultados demonstraram que, no início do tratamento, a infusão de ALN no segmento alongado aumentou o conteúdo ósseo mineral. No final do experimento, a densidade óssea mineral, a espessura óssea cortical e a resistência mecânica foram aproximadamente o dobro em relação ao controle. O ALN impediu significativamente a osteopenia que ocorre no início da fase de consolidação óssea.

Hofstaetter et al. (2010) estudaram em coelhos (n=32) o efeito em longo prazo de altas doses de ALN na microarquitetura e densidade óssea mineral. Aos animais do grupo experimental foi administrado ALN (150mg/kg/dia, subcutâneo, 3X/semana), os do grupo controle receberam solução salina. Os resultados obtidos por meio de microtomografia computadorizada mostraram que o ALN aumentou a densidade óssea mineral e a fração de volume ósseo nos dois períodos avaliados em comparação ao controle.

Para analisar a influência do ALN no reparo de defeitos ósseos, Jaime et al. (2005) confeccionaram defeito ósseo na calota craniana de 24 ratos ovariectomizados. No grupo experimental, o defeito foi preenchido com esponja de colágeno embebida por 30 min em solução 20 mg/ml de ALN e no controle com solução fisiológica. Após 30 dias, os animais foram sacrificados e, através da histomorfometria, foi demonstrado que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação à formação óssea, houve escassa neoformação apenas nas bordas dos defeitos, sendo o restante preenchido por tecido conjuntivo fibroso.

O efeito de um extrato medicinal na progressão da perda óssea e a ação do ALN foram comparadas por Lee et al. (2005) em seu estudo realizado em ratos ovariectomizados e submetidos à dieta deficiente em cálcio por quatro ou doze semanas. Os animais foram divididos em três grupos: controle (solução salina), grupo ALN (2mg/kg/dia) e grupo extrato medicinal (1,2ml/kg/dia). Os dados do estudo mostraram que o tratamento com ALN ou extrato medicinal produziu efeito muito fraco na prevenção da perda óssea induzida pela ovariectomia e deficiência de

cálcio. Tanto o ALN quanto o extrato medicinal aumentaram a densidade óssea mineral e a resistência mecânica do fêmur, porém esses efeitos não foram estatisticamente significantes.

Menezes et al. (2005) avaliaram o efeito terapêutico e profilático do ALN em diferentes concentrações na periodontite experimental (n= 114 ratos). Os animais receberam ALN por via subcutânea uma hora antes ou cinco dias após a indução da periodontite até o dia do sacrifício. Os autores concluíram que o ALN na forma profilática e terapêutica inibiu de forma significativa as lesões inflamatórias e a reabsorção óssea alveolar, demonstrando efeito anti-inflamatório e antimicrobiano em periodontite experimental.

Nos estudos de Reddy, Kumar e Veena (2005), em 05 pacientes, foram eleitos um total de 10 sítios que apresentavam periodontite crônica, perda óssea vertical e bolsa periodontal com profundidade entre 3 e 5mm. Em cada paciente, os dois locais selecionados foram divididos em controle e experimental. Após elevação de retalho mucoperiosteal, o defeito ósseo foi curetado e irrigado abundantemente com solução salina e aplicado ALN (1%) em gel no grupo experimental, enquanto no grupo controle foi realizado apenas o retalho e nenhuma substância foi utilizada. Ao final de três e seis meses, os pacientes foram submetidos à avaliação clínica e radiográfica, para avaliar o índice gengival, a profundidade de bolsa e o nível clínico de inserção das fibras periodontais. Os resultados mostraram que o medicamento apresentou efeito potente na diminuição da reabsorção e aumento da formação óssea, como também melhorou, de forma estatisticamente significativa, o índice gengival, a profundidade clínica de sondagem e o nível de inserção das fibras. Os autores ressaltaram que o ALN 1% na forma de gel é uma nova alternativa para o tratamento das periodontites.

Veena e Prasad (2010) avaliaram em 15 pacientes com periodontite crônica e profundidade de bolsa maior ou igual a 5 mm, a eficácia da aplicação local do gel de ALN (0,1ml) em defeitos ósseos periodontais. Foram selecionados 30 locais que radiograficamente apresentavam defeitos ósseos idênticos, localizados na região de molares inferiores, bilateralmente. Após descolamento do retalho, o ALN (experimental) e placebo (controle) foram aplicados nos defeitos. Parâmetros clínicos como, índice gengival, profundidade de bolsa e nível de inserção clínica,

foram realizados no início do estudo, três e seis meses após. Através da análise clínica e radiográfica, o ALN mostrou-se mais efetivo que o placebo em todos os parâmetros analisados, podendo ser utilizado no tratamento da periodontite associada à perda óssea.

A eficácia da aplicação local do gel de ALN a 1%, associado a alisamento e raspagem gengival, foi avaliada em pacientes com doença periodontal agressiva, por Sharma e Pradeep (2012a). Nos pacientes do grupo I, foram injetados 10 µl de gel de ALN a 1% (10mg/ml) nas bolsas periodontais e nos do grupo II (controle) foi usado placebo em forma de gel. Os resultados mostraram que a aplicação local de gel de ALN 1% reduziu de forma significativa a profundidade de sondagem, aumentou o nível de inserção do ligamento periodontal e melhorou o preenchimento ósseo em comparação ao grupo placebo.

Com base no fato de que o ALN inibe a reabsorção óssea e considerando a sua propriedade osteo estimulativa *in vivo* e *in vitro*, o estudo de Sharma e Pradeep (2012b) teve como objetivo explorar a eficácia da aplicação tópica do gel de ALN 1% comparando com um grupo placebo. Participaram da pesquisa 20 pacientes com periodontite crônica, que foram tratados com 10 µl ALN 1% (10mg/ml) ou placebo na forma de gel. O nível clínico de inserção, o índice de sangramento de sulco, a profundidade de sondagem e o índice de placa foram avaliados no início da pesquisa, dois e seis meses após, já as avaliações radiográficas foram realizadas no início e seis meses após o tratamento. Os resultados demonstraram que houve redução da profundidade de sondagem, ganho no nível clínico de inserção e que o preenchimento ósseo no grupo experimental foi significativamente maior que o controle aos 2 e 6 meses.

Pradeed et al. (2012) analisaram 60 pacientes portadores de defeitos de furca grau II, com o objetivo de explorar a eficácia da aplicação local do gel de ALN 1%, como adjunto no tratamento da raspagem e alisamento radicular. Primeiros molares assintomáticos com radiolusência na região da furca e profundidade de sondagem vertical maior ou igual a 5 mm e horizontal maior ou igual a 3mm foram incluídos na pesquisa. Os resultados obtidos por meio de exames clínicos e radiográficos demonstraram que houve redução da profundidade de sondagem, ganho do nível clínico de inserção vertical e horizontal, como também aumento significativamente

maior na percentagem de preenchimento ósseo no grupo do ALN em relação ao placebo. Os autores concluíram que a aplicação local de ALN a 1% pode ser uma nova opção no tratamento dos defeitos de furca grau II.

No propósito de determinar o efeito da aplicação local do ALN na regeneração óssea guiada ao redor de implantes dentários, Meraw, Reeve e Wollan (1999) realizaram um estudo em seis cães que receberam implantes revestidos com HA ou de titânio polido. Os implantes foram inseridos imediatamente após a extração dos pré-molares inferiores. Para cada tipo de implante, foram criados subgrupos, tendo sido a metade deles previamente embebida, durante uma semana, em ALN na concentração de 0,1 Mmol e comparada com implantes convencionais. Após 28 dias, os animais foram sacrificados e o osso adjacente ao implante foi avaliado através de microscopia digital computadorizada. Os autores concluíram que a aplicação local de ALN resultou em aumento significativo da quantidade de osso formado ao redor dos implantes.

Kawata et al. (2004) testaram o efeito do ALN na diferenciação osteoclástica e no volume ósseo em 135 camundongos submetidos à cirurgia para colocação de enxerto autógeno no tecido subcutâneo. Os animais foram divididos em grupo controle (solução salina) e experimentais (ALN dissolvido em 10 ml de solução salina). No grupo controle, o enxerto desapareceu em cinco semanas, no entanto, no grupo experimental, apenas cerca de 20 a 40% do enxerto foi reabsorvido. O grupo experimental foi subdividido em dois novos grupos: um grupo recebeu injeção intraperitoneal de ALN cinco semanas após a colocação do enxerto e o outro não recebeu o ALN, tendo o grupo medicado demonstrado redução significativa no número de osteoclastos. Os autores concluíram que o ALN na concentração de 10^{-4} M inibiu a reabsorção do enxerto ectópico.

Altundal e Gursay (2005) avaliaram a influência do ALN na formação óssea. Enxertos ósseos foram removidos do fêmur direito de 56 ratos, que foram posteriormente colocados em um defeito ósseo confeccionado a 5mm de distância do sítio doador. Os animais foram distribuídos em grupos basal, solução salina e ALN (0,25mg/kg/dia, subcutâneo). Análises bioquímicas e histológicas foram realizadas 2, 4 e 12 semanas após o procedimento cirúrgico. Os resultados revelaram que o ALN, além de efeito antirreabsortivo, exerceu efeito na formação de

novo osso, podendo ser considerado como uma opção terapêutica para melhorar a formação óssea em diferentes casos de remodelamento ósseo.

Através de avaliação bioquímica e análise histológica, Altundal et al. (2007) estudaram o efeito inibitório do ALN na reabsorção de enxerto autógeno livre. Cinquenta e seis ratos foram divididos em grupo experimental (ALN 0,25 mg/kg/dia-subcutâneo), durante duas, quatro e doze semanas e grupo controle (solução salina). Amostras de urina e sangue foram coletadas durante a noite, para avaliação dos marcadores da remodelação óssea. Após 2, 4 e 12 semanas, os animais foram sacrificados e os resultados demonstraram que o ALN ocasionou redução significativa nos marcadores bioquímicos da remodelação óssea e que houve redução no número de osteoclastos e nas lacunas reabsortivas. Os autores concluíram que o ALN pode ser uma escolha terapêutica na diminuição da reabsorção de enxertos ósseos.

Toker et al. (2012) avaliaram se a aplicação local ou sistêmica de ALN aumentaria a atividade osteoblástica e a formação de novo osso em enxerto autógeno. Defeitos de 5 mm de diâmetro foram confeccionados na calota craniana de 40 ratos distribuídos em grupos: I) controle; II) enxerto autógeno; III) enxerto + 0,01mg/kg/dia de ALN administrado sistemicamente por 8 semanas; e IV) enxerto embebido em solução de ALN 1mg/ml aplicado localmente por 5min. Os resultados demonstraram que a administração local ou sistêmica do ALN promoveu aumento da atividade osteoblástica e da formação de novo osso nos enxertos autógenos.

Graziani et al. (2008) estudaram as mudanças na crista e no rebordo alveolar em 40 pacientes, após exodontia de terceiros molares, submetidos a diferentes tipos de tratamento local. O grupo 1 (controle negativo) não recebeu tratamento; no grupo 2 foi inserida esponja de colágeno endoalveolar; o grupo 3 recebeu ALN-70mg/semana sistemicamente, por quatro meses; o grupo 4 foi submetido à inserção de esponja de colágeno endoalveolar + ALN sistêmico. De acordo com os resultados, foi possível observar que, imediatamente após a cirurgia, o nível de crista e do rebordo não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os quatro grupos, porém após 4 meses, os grupos 2, 3 e 4 apresentaram menor reabsorção óssea. Os autores ressaltaram que o ALN pode ser administrado

sistemicamente com sucesso para reduzir a reabsorção óssea alveolar vertical e tornar a cicatrização intra-alveolar mais rápida.

Aguirre et al. (2010) realizaram um estudo em ratos submetidos à exodontia dos primeiros molares inferiores, com o objetivo de identificar o efeito do ALN na cicatrização do alvéolo e do osso alveolar interdentário. Os animais foram divididos em grupo controle (solução salina) e experimental (ALN). As substâncias foram administradas por via subcutânea por um período de três a quatro semanas previamente às exodontias e no pós-operatório por 10, 21, 35 e 70 dias. O tratamento com ALN aumentou o volume ósseo alveolar interdental e a altura óssea só no décimo dia pós-operatório. Os autores concluíram que o ALN diminuiu transitoriamente a formação óssea e vascularização no alvéolo dentário.

A ação do ALN na reabsorção alveolar foi avaliada em ratos submetidos à exodontia, nos estudos de Altundal e Güvener (2004). Os animais foram distribuídos em grupo experimental (ALN 0,25 mg/kg) e grupo controle (solução salina). As substâncias foram aplicadas por via subcutânea. Através de exame histológico, foi avaliado o número de osteoblastos e osteoclastos, bem como a espessura do osso alveolar por vestibular e lingual. Foi demonstrado que a redução do volume ósseo foi significativamente menor no grupo do ALN em relação ao controle; houve também redução no nível do cálcio sérico e urinário e no número de osteoclastos, revelando que houve supressão pronunciada da reabsorção óssea no grupo tratado com o ALN. Os autores concluíram o trabalho afirmando que o ALN é uma opção terapêutica para os vários tipos de reabsorção que ocorrem na Odontologia.

Levin et al. (2001) avaliaram a ação do ALN no reparo do ligamento periodontal, em uma pesquisa realizada em cães submetidos à exodontia e reimplante dentário após um período extra-alveolar a seco de 60min. No grupo experimental, antes do reimplante, os dentes foram imersos em solução de ALN 1 mM e, no grupo controle, em solução em salina balanceada de Hank por 5min. Houve melhora estatisticamente significativa no reparo do ligamento periodontal nos dentes do grupo experimental em relação ao controle.

Lustosa-Pereira et al. (2006) também estudaram o efeito da aplicação tópica do ALN na prevenção da reabsorção radicular pós reimplante dentário. Realizaram-se exodontia e reimplante de 54 incisivos superiores direitos de ratos. Os animais

foram divididos em três grupos de acordo com o período extra-alveolar, no grupo I os dentes permaneceram a seco por 15 min, no grupo II por 30 min e no grupo III por 60 minutos. Em seguida, os dentes foram imersos em hipoclorito de sódio 1% por 5 min para remoção das fibras do ligamento periodontal, lavados e imersos em solução de 3,2 mg/L ALN, para tratamento da superfície radicular. Os animais foram sacrificados 15, 60 e 90 dias após o reimplante e os espécimes submetidos à análise microscópica. O ALN reduziu de forma significativa a incidência de reabsorção radicular, no entanto não impediu a anquilose dentária.

Através de análise histológica e tomográfica, Komatsu et al. (2008) pesquisaram o efeito do ALN tópico em dentes de ratos reimplantados. Após exodontia, os primeiros molares superiores foram colocados em solução de ALN 1 mM (experimental) ou solução salina (controle) por 5 min e em seguida reimplantados; foi instituído um grupo controle denominado normal, no qual os dentes não foram extraídos, padrão-ouro para inserção do ligamento periodontal. O ALN reduziu de forma estatisticamente significativa a reabsorção óssea e radicular e estimulou a formação óssea ao redor dos dentes reimplantados, porém não inibiu a anquilose e a mineralização pulpar.

Aspenberg e Åstrand (2002) estudaram a ação da solução de ALN (1mg/ml, por 10 minutos) em enxertos ósseos implantados bilateralmente na epífise de ratos. Após seis semanas, os animais foram sacrificados e as amostras submetidas à análise histomorfométrica para avaliar a neoformação óssea e a reabsorção do enxerto. Os resultados demonstraram que o enxerto tratado previamente com ALN local apresentou-se totalmente intacto, enquanto no lado controle foram totalmente reabsorvidos. Os autores concluíram que a aplicação local de ALN não apresenta efeitos adversos, como também evita a perda do enxerto por reabsorção.

Para testar a hipótese de que o tratamento com ALN tópico melhora o contato osso-implante, a densidade óssea e a fixação de implantes inseridos pela técnica de compactação, Jakobsen et al. (2006) realizaram pesquisa em oito cães, nos quais foram inseridos dezesseis implantes de titânio que receberam tratamento prévio com 15ml de solução de ALN (1mg/ml) injetado lentamente na loja cirúrgica por 60 segundos. Após o tratamento da superfície, os implantes foram inseridos no joelho direito de cada animal, através da técnica de compactação. Os dados obtidos por

meio de análise histomorfométrica mostraram que, no grupo experimental, o contato osso-implante e a densidade óssea ao redor dos implantes foram maiores, no entanto, não houve aumento na fixação mecânica.

Em 2007, Jakobsen et al., com o mesmo objetivo, administraram localmente 5 ml de solução de ALN (na concentração de 2mg/ml) por 60 segundos na tíbia direita de 10 cães, enquanto no lado esquerdo (controle) foi aplicada solução salina. O teste biomecânico demonstrou que houve aumento em todos os parâmetros biomecânicos no grupo tratado em relação ao controle. Histomorfometricamente foi demonstrado que o ALN promoveu aumento médio de 23% no contato osso-implante e de 129% na fração de volume ósseo periimplante. Os autores concluíram que o ALN local pode aumentar a osseointegração e fixação biomecânica de implantes inseridos pela técnica de compactação. Em 2009, Jakobsen et al., utilizando a mesma metodologia, encontraram resultados semelhantes para implantes revestidos com HA.

Killeen et al. (2012) realizaram pesquisa com o objetivo de avaliar se o ALN aplicado local ou sistemicamente é capaz de aumentar o crescimento do osso. Defeitos ósseos foram criados do lado direito da mandíbula de 65 ratos. Após 21 e 48 dias, os animais foram sacrificados e através da análise histomorfométrica foi demonstrado que todos os grupos apresentaram aproximadamente 100% de preenchimento do defeito ósseo. Os autores concluíram que o ALN apresentou efeito potencial no aumento ósseo local.

Srisubut et al. (2007), visando avaliar o efeito anabólico do ALN aplicado localmente, realizaram uma pesquisa em 26 ratos divididos em grupo experimental (defeito ósseo preenchido com vidro bioativo embebido em solução de ALN) e controle (vidro bioativo embebido em solução salina). Após quatro semanas, os animais foram sacrificados e, através da análise histomorfométrica, foi demonstrado que no grupo experimental a formação óssea foi estatisticamente superior à do grupo controle. Os autores concluíram que uma simples dose de ALN local melhora a formação óssea e pode ser considerada como uma opção terapêutica para diferentes casos de remodelação óssea.

Bodde et al. (2008) realizaram um estudo em coelhos para avaliar se a incorporação do ALN ou do omeprazol ao cimento ósseo bioativo poderia aumentar

a densidade e volume ósseo local, assim como o contato osso implante, pela inibição da atividade dos osteoclastos. Defeitos ósseos foram confeccionados no fêmur de 24 animais e preenchidos com cimento ósseo bioativo (grupo I), ALN incorporado ao cimento bioativo (grupo II) ou omeprazol incorporado ao cimento ósseo (grupo III). As análises histomorfométrica e microtomográfica demonstraram que a aplicação tópica do ALN e do omeprazol não elevou as condições ósseas locais e o contato osso implante.

Com o objetivo de elucidar a atividade osteogênica e o sucesso a longo prazo do ALN, omeprazol e levostatina nas cirurgias artroplásticas, Cottrell et al. (2010) desenvolveram uma pesquisa em ratos que foram submetidos a cirurgia para confecção de defeitos ósseos bilaterais e inserção de implantes de hidrogel. Exames por imagem, como radiografias e microtomografias, como também análises histomorfométricas foram realizados para avaliar a densidade óssea mineral e o volume ósseo no local do defeito. Os autores concluíram que o ALN aplicado localmente, diferente do omeprazol e da levostatina, levou a aumento significativo de novo osso no defeito, podendo esse medicamento ser utilizado para aumentar o sucesso das cirurgias artroplásticas.

Xue e Haisheng et al. (2010) analisaram suínos submetidos a artrodese da coluna vertebral, com o objetivo de avaliar a influência do ALN na fixação da interface osso parafuso. Os animais foram divididos em dois grupos: onze suínos receberam 10 mg/dia de ALN (via oral) por três meses, enquanto os demais pertenceram ao grupo controle. Apesar de o ALN ter aumentado a força biomecânica na interface osso parafuso pedicular, os resultados demonstraram nível de significância limitado.

O efeito anabólico do ALN e do zolendronato na durabilidade em longo prazo de próteses ortopédicas, foi testado por Von Knock et al. (2007), em estudo realizado em coelhos (n=36), nos quais foram inseridos implantes revestidos com partículas submicrométricas de polietileno de peso molecular ultraelevado. Os animais foram divididos em três grupos: grupo I (controle, sem tratamento), grupo II (ALN subcutâneo 1,0 mg/kg/semana), grupo III (dose única de zoledronato 0,015mg/kg- intravenosa, no trans-operatório). Os animais foram sacrificados após 6 e 12 semanas. Os resultados revelaram que o ALN e o zolendronato, além de

suprimirem a reabsorção óssea, apresentaram efeito anabólico sobre o osso ao redor de implantes ortopédicos *in vivo*, e que esses efeitos foram reforçados com a utilização de polietileno de peso molecular ultraelevado.

A eficácia do ALN na redução da perda de próteses de titânio utilizadas nas reconstruções articulares foi testada por Zhu et al. (2010) em coelhos (n=46). O efeito da administração do ALN (40mg, 201mg e 404mg), incorporado ao cimento ósseo e aplicado localmente, foi comparado com um grupo que recebeu injeção subcutânea de ALN 1mg/kg/semana. Os resultados demonstraram que o ALN aplicado local e sistemicamente inibe a osteólise induzida por partículas de titânio, melhorando dessa forma a quantidade de osso ao redor do implante, como também a sua fixação. De acordo com os resultados, não houve diferenças estatisticamente significantes entre o controle e o grupo tratado com ALN local e sistêmico.

A ação do ALN e sua associação com a HA no reparo de defeitos ósseos foram avaliadas por Fernandes, Faig-Leite e Carvalho (2004). Vinte e sete coelhos foram distribuídos em três grupos: I) controle (sem medicação), II) ALN sistêmico (1mg/kg/dia/10dias) e III) ALN (sistêmico) + HA (localmente no defeito). Os animais foram sacrificados após 14, 21 e 28 dias e os espécimes submetidos à análise histomorfométrica. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os tratamentos, durante os períodos de observação, havendo aumento nos valores das médias em relação aos três períodos, com formação óssea progressiva, independentemente do tratamento realizado. O ALN e sua associação com a HA não interferiram na reparação óssea no modelo experimental.

Fernandes (2005) estudou o efeito do uso local do ALN, da HA e da associação ALN/HA em diferentes concentrações molares, no processo de reparação de defeitos ósseos em fêmures de 168 ratos machos e fêmeas. Os animais foram divididos em grupo controle, amido, ALN 1 mol, ALN 2 moles, HA 1 mol, HA 2 moles e ALN/HA. Aos 7 e 21 dias, os animais foram sacrificados e, de acordo com os resultados, houve neoformação óssea em todos os grupos, com exceção dos animais machos tratados com ALN. Houve diferenças estatisticamente significantes entre machos e fêmeas no tocante ao uso do ALN. A aplicação local do ALN interferiu negativamente na reparação óssea, tendo a reparação óssea sido maior nas fêmeas, independentemente do período estudado.

Com intuito de avaliar a ação local do ALN, da HA e da associação destas substâncias no reparo de defeitos ósseos, Canettieri et al. (2009) realizaram uma pesquisa em 98 ratos fêmeas ovariectomizados. Os animais foram divididos em grupo controle (C), amido (S), ALN 1 mol (A1), ALN 2 moles (A2), hidroxiapatita 1 mol (HA1), HA 2 moles (HA2) 1 e associação do ALN com hidroxiapatita (A+ HA). Após 7 e 21 dias, os animais foram sacrificados e os espécimes submetidos a análise histomorfométrica. Os resultados demonstraram que o ALN isolado ou em associação com a HA apresentou efeito nocivo sobre a reparação do defeito ósseo e que a maioria dos animais dos grupos A1, A2 e A+HA não mostrou formação óssea na região central do defeito, diferentes do grupo HA2 que apresentou maior formação óssea.

Com o objetivo de investigar se a aplicação de ALN poderia melhorar a formação óssea após enxerto de HA, Arslan et al. (2011) desenvolveram uma pesquisa em 36 ratos osteoporóticos divididos em grupo experimental (enxerto de HA embebida em solução de ALN) e grupo controle (HA embebida em solução salina). Através da histomorfometria foi observada formação de novo osso nos bordos do defeito cirúrgico em ambos os grupos, não havendo, diferenças estatisticamente significantes entre eles. Os resultados demonstraram que uma única dose de ALN tópica associada ao enxerto de HA induziu a um ligeiro aumento na regeneração óssea e que esse pode ser útil em defeitos ósseos alveolares. Os autores concluíram que a associação do ALN com a HA, mostrou tendência a uma melhor formação óssea após 4 e 8 semanas, não sendo a diferença entre os grupos estatisticamente significativa.

Gill, Gupta e Sikri (2011) avaliaram clínica e radiograficamente 15 pacientes portadores de defeitos ósseos periodontais, com o objetivo de avaliar a eficácia do enxerto de HA associado ou não à solução de ALN. Parâmetros clínicos como profundidade de sondagem e nível de inserção foram avaliados. O defeito de um dos lados do arco foi preenchido com HA e o lado contralateral com HA mais solução de ALN (200 µg). O ALN associado à HA promoveu preenchimento ósseo linear melhor no local da cirurgia, sugerindo que a associação de enxerto aloplástico ao ALN potencializou a regeneração óssea.

2.4 ASSOCIAÇÃO OSSO BOVINO LIOFILIZADO + BISFOSFONATOS

Houshmand et al. (2007) investigaram se o pamidronato de sódio estimula a ação do Bio-Oss® no reparo de defeitos ósseos confeccionados na mandíbula de ovelhas (n=8). Em cada animal foram executados três defeitos de 6mm de diâmetro. Os animais foram distribuídos em grupos: controle negativo (coágulo sanguíneo), controle positivo (Bio-Oss®) e experimental (1mg de pamidronato de sódio 90 mg dissolvido em 10ml de água destilada). Os animais foram sacrificados após seis semanas e os resultados histológicos demonstraram que a quantidade de osso formado foi estatisticamente maior no grupo experimental em relação aos demais. A associação do pamidronato de sódio ao Bio-Oss® melhorou a formação óssea devido a um aumento da percentagem de osso trabecular e diminuição significativa do número de osteoclastos no osso regenerado.



Proposição

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do ALN, nas concentrações de 0,5 e 1%, associados ao osso bovino inorgânico (Bio-Oss®) no reparo de defeitos ósseos críticos confeccionados em calvária de coelhos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A partir de imagens de radiomicrografia de calvária de coelhos, busca-se especificamente:

- a) Avaliar se o ALN, nas concentrações de 0,5 e 1%, associado ao Bio-oss®, acelera o reparo ósseo, quando comparado ao Bio-Oss® isoladamente;
- b) Avaliar qual das concentrações do ALN, 0,5% ou 1%, promove melhor reparo ósseo, quando associados ao Bio-Oss®;
- c) Avaliar o efeito do ALN a 0,5 e 1% no processo de reparo de defeitos ósseos críticos.



Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Foram adotados os Princípios Éticos em Experimentação Animal, preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), instituição filiada ao *International Council for Laboratory Animal Science*, e a Legislação Brasileira de Animais de Experimentação, Lei Federal nº 11.794, de 09 de outubro de 2008. Esta pesquisa foi desenvolvida após aprovação do seu projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), nº 0409\11 (ANEXO A).

4.2 PROBLEMA

A aplicação tópica de ALN nas concentrações de 0,5 e 1% interfere no reparo de defeitos ósseos confeccionados em calvária de coelhos?

4.3 HIPÓTESES

H₀ = A aplicação tópica de ALN nas concentrações de 0,5 e 1%, associado ao osso bovino inorgânico, não estimula a reparação óssea em defeitos críticos confeccionados em calvária de coelhos.

H₁ = A associação do ALN 0,5% ao osso bovino inorgânico, inseridos localmente em defeitos ósseos confeccionados em calvária de coelhos, acelera a reparação óssea.

H₂ = A associação do ALN 1% ao osso bovino inorgânico, inseridos localmente em defeitos ósseos confeccionados em calvária de coelhos, acelera a reparação óssea.

H₃ = A aplicação tópica de ALN a 0,5%, associado ao osso bovino inorgânico, promove maior percentual de reparação óssea de defeitos confeccionados em calvária de coelhos, quando comparada à adição do ALN 1%.

H₄ = A aplicação tópica de ALN isoladamente nas concentrações de 0,5% e 1% acelera a reparação óssea de defeitos confeccionados em calvária de coelhos, sendo mais rápida na menor concentração.

4.4 SELEÇÃO E TAMANHO DA AMOSTRA

A amostra foi constituída por 40 coelhos machos brancos da raça Nova Zelândia, adultos, com idade de aproximadamente seis meses, não portadores de patologias sistêmicas, com massa corporal variando de 3 a 4 kg (Figura 03), advindos do Biotério do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba - LTF\UFPB. Os coelhos foram utilizados como modelo experimental devido à sua anatomia, metabolismo e custo não proibitivo para o desenho deste experimento. O tamanho da amostra e o número de coelhos em cada grupo foram determinados com respaldo na literatura científica, em periódicos com desenho experimental semelhante (ECKELMAN et al., 2007; DEMY et al., 2010).



Fig. 03: Coelho macho branco da raça Nova Zelândia, modelo animal utilizado na pesquisa.
Fonte: Dados da pesquisa (UFPB, 2013).

4.5 ACONDICIONAMENTO E ALIMENTAÇÃO DOS ANIMAIS

Antes e durante o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas individuais e tradicionais, confeccionadas em malha galvanizada, medindo 0,90m x 0,60m x 0,45m, suspensas a 0,80m do chão, atapetadas com maravalha de pinos. Foram mantidos no Laboratório de Experimentação Animal do Centro de Ciências da Saúde (LEA\CCS) da UFPB, em temperatura de $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$, com 50 a 60% de umidade e ciclo circadiano de 12 horas. A partir daí, passaram por um período de quarentena para posterior liberação para o estudo. Os animais foram pesados semanalmente e operados após adquirir o peso entre 3 a 4 kg e em torno

de seis meses de idade, quando adquiriram maturidade sexual. A limpeza das gaiolas foi efetuada de acordo com o protocolo do laboratório.

A dieta padrão após o desmame foi constituída por 150g/dia de ração balanceada na forma peletizada (Coelhil “R”, Socil, João Pessoa/PB, Brasil), fornecida diariamente obedecendo a horários e quantidades regulares para evitar a formação e a proliferação de fungos por exposição do alimento. Durante todo o experimento, a água foi fornecida *ad libitum*.

Cada gaiola e cada coelho foi identificado individualmente (Figura 04). Para cada animal foi confeccionado um formulário específico contendo: nome do experimento, responsável pela pesquisa, grupo, massa corporal, datas de nascimento, cirurgia e sacrifício.



Fig. 04 - Coelho Nova Zelândia mantido em gaiola individual.
Fonte: Dados da pesquisa (UFPB, 2013).

4.6 DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS

Os 40 coelhos foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (n=8 cada): **GI** = Bio-Oss®; **GII** = Bio-Oss® + ALN 0,5%; **GIII** = Bio-Oss® + ALN 1%; **GIV** = ALN 0,5%; **GV** = ALN 1% (Quadro 01).

Quadro 01- Distribuição dos animais nos grupos experimentais.

Grupos	n	Substância experimental (cavidade esquerda)	Controle de cada grupo (cavidade direita)
GI	8	Bio-Oss®	Coágulo sanguíneo
GII	8	Bio-Oss® +ALN 0,5%	Coágulo sanguíneo
GIII	8	Bio-Oss® +ALN 1%	Coágulo sanguíneo
GIV	8	ALN 0,5%	Coágulo sanguíneo
GV	8	ALN 1%	Coágulo sanguíneo
Total	40	-	-

n = número de animais, ALN = Alendronato de sódio

Fonte: Dados da pesquisa (UFPB, 2013).

4.7 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Todos os procedimentos realizados que pudessem vir a resultar em ansiedade e/ou dor nos animais, foram conduzidos sob anestesia geral. Os animais permaneceram em dieta zero seis horas antes da cirurgia, no entanto receberam água *ad libitum*. Os coelhos foram pesados antes do procedimento em balança digital de precisão para cálculo da dose por quilo de peso e submetidos à anestesia profunda por via intramuscular, utilizando seringa descartável de 3ml e agulha descartável 25x7; na região medial do membro pélvico, por meio da aplicação de Cloridrato de Xilazina 2% (Rompun®, Bayer Ltda., São Paulo/SP, Brasil), na dose de 5mg/kg e, em seguida, foi administrado Cloridrato de Ketamina a 1% (Dopalen, Vetbrands Ltda., São Paulo/SP, Brasil), na dose de 20mg/kg, conforme recomendação do fabricante (Figura 05).



Fig. 05 - Cloridrato de Xilazina 2% (Rompun®) e Cloridrato de Ketamina 1% (Dopalen) utilizados para anestesia geral.

Fonte: Dados da pesquisa (UFPB, 2013).

Após 2 a 5 minutos, período de latência do anestésico, os animais mantidos em decúbito ventral na mesa cirúrgica foram submetidos à tricotomia, degermação e antissepsia na região superior da cabeça, entre os pavilhões auriculares externos, com solução de digluconato de clorexidina a 2% e aposição de campo operatório fenestrado confeccionado em TNT (tecido não tecido), estéril, medindo 20 X 20 cm. Para a realização da hemostasia e da analgesia trans e pós-operatória, foi feita infiltração no local com cloridrato de mepivacaína 2%, com epinefrina 1: 100.000 (Mepíadre DFL, Rio de Janeiro, Brasil) (Figura 06).



Fig. 06 – Anestesia local infiltrativa com cloridrato de mepivacaína 2% e epinefrina 1:100.000.
Fonte: Dados da pesquisa (UFPB, 2013).

Após a infiltração anestésica, foi realizada incisão sagital linear na região frontoparietal, medindo cerca de 4 cm de extensão, com lâmina de bisturi nº 15C, montada em cabo de bisturi Bard Parker n.3 (Figura 07A e 07B), seguindo-se do descolamento do retalho com descolador de Molt nº2 e da exposição da superfície externa da calvária (Figura 07C).

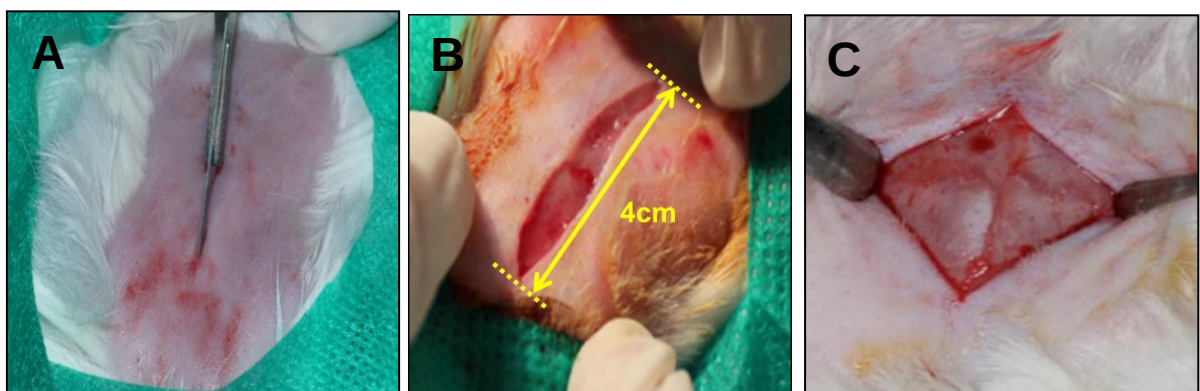


Fig. 07A e B – Incisão sagital linear na região frontoparietal, medindo cerca de 4cm de extensão; **C)** Exposição da calvária após descolamento mucoperiosteal.
Fonte: Dados da pesquisa (UFPB, 2013).

Foram confeccionados dois defeitos críticos na porção central dos ossos parietais, um a cada lado da sutura interparietal, com 10 mm de diâmetro, tendo como limite a dura-máter, utilizando-se uma broca trefina de 10 mm de diâmetro interno (Neodent, Curitiba, Brasil), montada em contra-ângulo 20:1 (WH, Áustria), com motor elétrico programado a 10.000 rpm (Driller® BLM 600 Plus, VK Driller equipamentos Elétricos Ltda., Jaguaré/SP, Brasil) e irrigação constante com solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% (Darrow Laboratórios, Rio de Janeiro, Brasil) (Figuras 08, 09 e 10). Após a confecção dos defeitos ósseos, foi realizada abundante irrigação com solução fisiológica, para remoção dos resíduos gerados no processo de confecção dos defeitos, os quais foram secados com gaze estéril de forma cuidadosa, para manter a dura-máter íntegra.



Fig. 08 – Confeção do defeito ósseo utilizando broca trefina de 10 mm de diâmetro interno, montada em contra-ângulo.
Fonte: Dados da pesquisa (UFPB, 2013).



Fig. 09 - Fragmentos ósseos removidos pela broca trefina.
Fonte: Dados da pesquisa (UFPB, 2013).

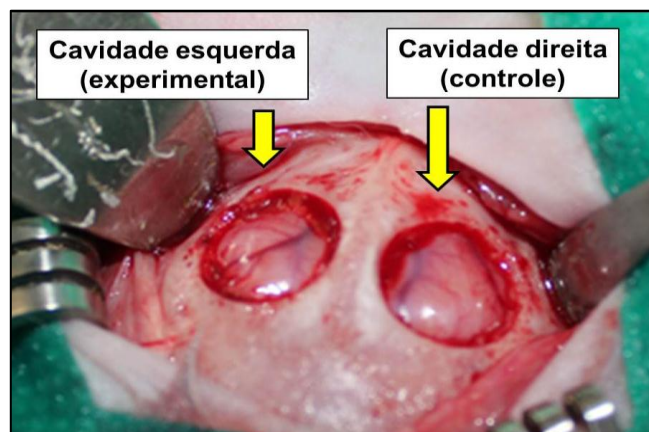


Fig. 10 - Defeitos ósseos bilaterais nos ossos parietais.
Fonte: Dados da pesquisa (UFPB, 2013).

Após a limpeza, os defeitos do lado controle e experimental foram forrados com barreira para regeneração óssea guiada com objetivo de proteger a dura-máter e evitar penetração de tecido conjuntivo na loja cirúrgica. Foi utilizado a membrana de cortical óssea bovina liofilizada (GenDerm 30x30, Baumer®, Mogi Mirim/SP, Brasil), apresentando período de reabsorção entre 90 e 100 dias (Figuras 11A e 11B).



Fig. 11– A) Membrana de cortical óssea reabsorvível (GenDerm, Baumer®) e **B)** respectiva embalagem com especificações.

Fonte: Dados da pesquisa (UFPB, 2013).

Na cavidade controle de cada animal não foi utilizado material de preenchimento, sendo preenchida por coágulo sanguíneo autólogo, enquanto na cavidade esquerda foram inseridas as substâncias-teste correspondente a cada grupo experimental: **G1** = Osso bovino liofilizado - Bio-Oss®; **GII** = Bio-Oss® + ALN 0,5%; **GIII** = Bio-Oss® + ALN 1%; **GIV** = ALN 0,5%; **GV** = ALN 1% (Figura 12A, 12B e 12C).

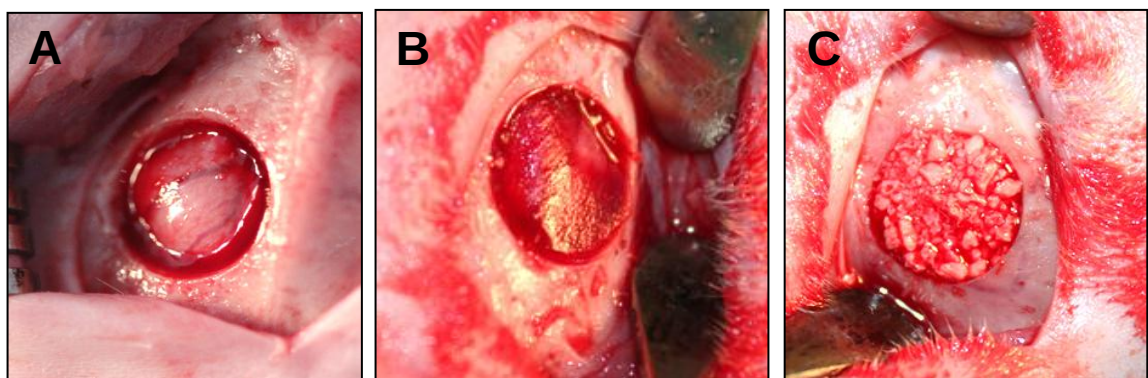


Fig. 12 – A) Defeito ósseo preenchido com coágulo sanguíneo; **B)** Defeito forrado com membrana biológica e embebido em solução de ALN 0,5%; **C)** Defeito ósseo preenchido com Bio-Oss®.

Fonte: Dados da pesquisa (UFPB, 2013).

O osso de cortical bovino liofilizado utilizado (Bio-Oss®, Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland) (Figuras 13A e 13B), possui granulação grande (1 a 2mm), visando obter mais espaço entre as partículas e favorecer o crescimento ósseo.

No GI, após umidificado com solução salina, o biomaterial foi inserido nos defeitos delicadamente de forma que não fosse comprimido excessivamente e mantivesse espaço suficiente para a formação de novo osso. A inserção do material foi realizada através de cureta alveolar de Lucas (Quinelato®, Rio Claro/SP, Brasil).

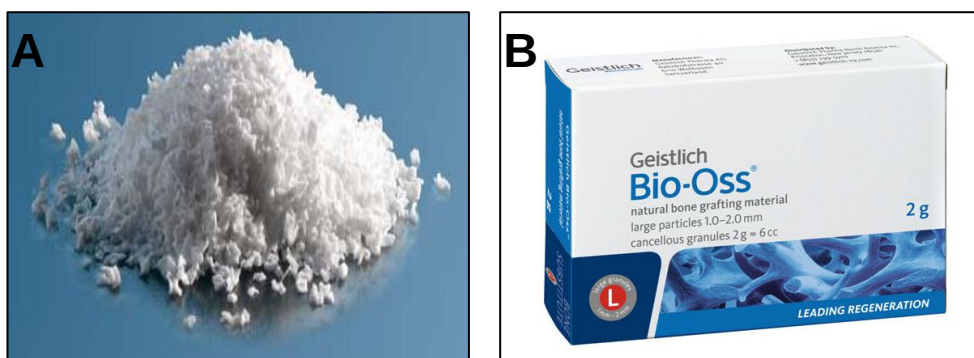


Fig. 13–A) Ilustração dos grânulos de Bio-Oss® 1.0-2.0mm e **B)** respectiva embalagem com especificações.

Fonte: web - www.geistlich.com.br

O ALN nas concentrações de 0,5% (5mg/ml) e 1% (10mg/ml) foi manipulado na farmácia de manipulação Ao Farmacêutico - Farmácia de Manipulação Ltda. (Maceió, Brasil), conforme especificado no ANEXO B.

Nos grupos II e III os defeitos experimentais foram preenchidos com o Bio-Oss® embebido em ALN (0,15ml), nas concentrações de 0,5 e 1%, respectivamente, inserido nas cavidades através de uma cureta alveolar.

O ALN 0,5 e 1% foi utilizado de forma isolada nos grupos IV e V, respectivamente, inserido no defeito ósseo com auxílio de seringa descartável de 1ml, sendo injetados 0,15ml da solução.

Após a inserção do material teste, todas as cavidades (controle e experimental) foram cobertas por um recorte de membrana biológica (Figura 14). Nos grupos IV e V, as membranas foram inseridas 01 minuto após a aplicação do ALN.

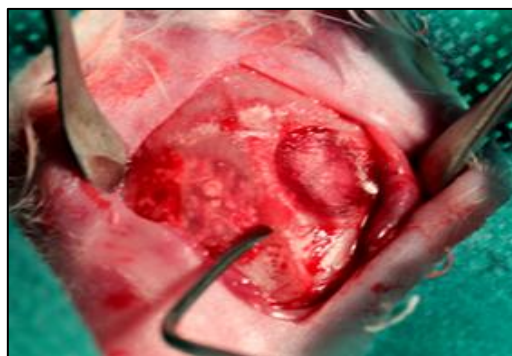


Fig. 14: Defeitos cobertos com membrana biológica.
Fonte: Dados da pesquisa (UFPB, 2013).

Em seguida houve o reposicionamento do periósteo e sutura interna por meio de pontos simples com fio de poligalactina 910 (Vicryl® 4-0, Ethicon Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil) e sutura externa da derme com fio mononylon 5-0 (Mononylon® 5-0, Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil). Finalizado o procedimento, os coelhos foram devolvidos às suas gaiolas para recuperação anestésica.

4.8 EUTANÁSIA

Decorridos os períodos experimentais de 30 e 60 dias, os animais foram anestesiados como o descrito para os procedimentos operatórios e eutanasiados com injeção intramuscular e dose excessiva de Cloridrato de Ketamina a 1% (Dopalen, Vetbrands Ltda., São Paulo, Brasil), na dose de 50mg/kg, conforme recomendação do fabricante e de acordo com o COBEA.

As carcaças dos animais foram acondicionadas em saco plástico apropriado, temporariamente armazenadas em freezer, até serem encaminhadas à destinação final pelo LTF\CCS\UFPB.

4.9 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Para obtenção das peças, foi realizada uma incisão trapezoidal de espessura total, abrangendo os tecidos moles da região parietal da calvária. A porção do crânio que continha os defeitos foi removida, usando-se discos diamantados montados em mandril (K. G. Sorensen®, Medical Burs Ind. e Com. de Pontas e Brocas Cirúrgicas Ltda., Cotia/SP, Brasil) para peça reta (Kavo®, KaVo do

Brasil Ind. Com. Ltda, Rio de Janeiro/RJ, Brasil) acoplada a micromotor elétrico (Driller® BLM 600 Plus, VK Driller equipamentos Elétricos Ltda., Jaguaré/SP, Brasil), sob baixa e intermitente rotação, com irrigação constante de solução salina fisiológica 0,9% para evitar a desidratação dos blocos.

Os espécimes compostos de tecido ósseo da calvária dos coelhos foram fixados em formalina tamponada a 10% com pH 7,0.

4.10 ANÁLISE RADIOMICROGRÁFICA

A análise por radiomicrografia foi realizada no Laboratório da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade Federal de São Paulo (ESALQ/USP) em Piracicaba/SP (Brasil).

As radiomicrografias das calvárias dos 40 coelhos foram obtidas com auxílio do aparelho Faxitron X-Ray®, modelo MX20 digital, (Faxitron Bioptics, Tucson Arizona, USA), com 20kv e 0,3 mA, resolução de 20 micrometros e ânodo de tungstênio (Figuras 15A e 15B). Para cada tomada radiográfica as calvárias foram colocadas sobre uma placa e com posicionamento padronizado das mesmas para incidência do feixe de raios X (Figura 16).



Fig. 15: A) Aparelho Faxitron X-Ray ® modelo MX20 digital. B) Detalhe do painel de controle do aparelho.

Fontes: A) web - <http://www.faxitron.com/products>. B) Dados da pesquisa (UFPB, 2013).

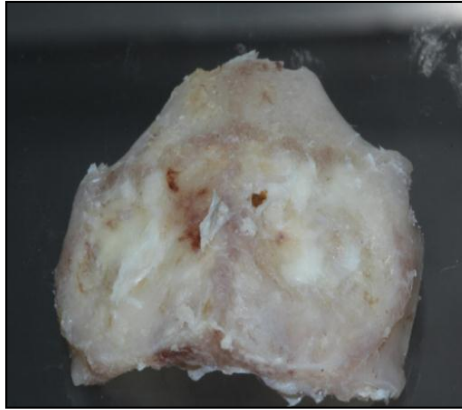


Fig. 16: Calvária posicionada no interior do aparelho Faxitron X-Ray® para obtenção de imagem radiomicrográfica digitalizada.
Fonte: Dados da pesquisa (UFPB, 2013).

As imagens obtidas por radiomicrografia foram analisadas através de um programa de imagem digitalizada de domínio público *Image J® software*, versão 1.41 (Figura 17), com objetivo de quantificar o preenchimento ósseo. O *Image J®* é um programa analítico que descreve a distribuição estatística dos níveis de cinza em termos de números de amostras (pixels), permitindo a manipulação da imagem, alterando o contraste, aplicando filtros, reconhecendo margens, suportando funções aritméticas, lógica de imagens e processamento.

Através de ferramentas de manipulação de imagens do programa foi obtido o valor do preenchimento do defeito ósseo nos períodos de 30 e 60 dias.

Na sequência de manipulação das imagens, utilizando-se a ferramenta “*menu file—>open*” do *Image J®* uma das imagens radiomicrografadas selecionada é aberta (Figura 17) e duplicada por meio da ferramenta “*image -> duplicate*”. A imagem duplicada deve ser salva no formato TIFF (*Tag Image File Format*), tipo de arquivo mais utilizado para aplicações científicas, pois permite o armazenamento de quaisquer informações junto com a imagem, assegurando que as informações salvas não sejam perdidas.

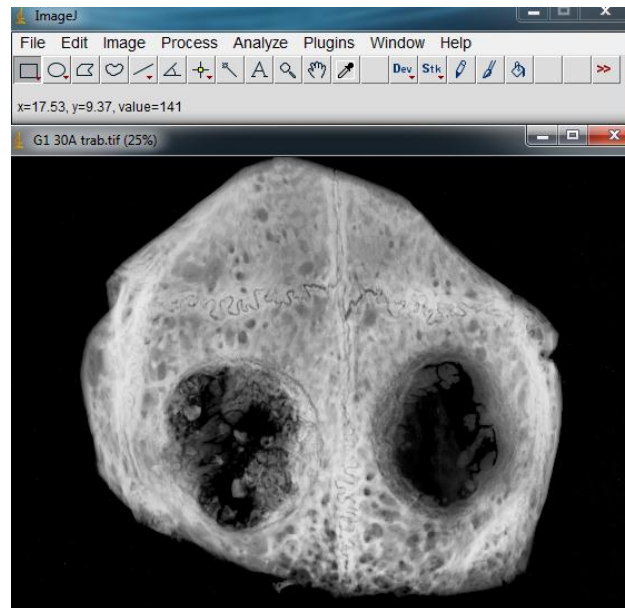


Fig. 17: Janela principal do programa *Image J*®, mostrando imagem da calvária obtida pela radiomicrografia, já duplicada. Observe a imagem dos defeitos ósseos: à esquerda, cavidade experimental, e à direita, cavidade controle.

Fonte: Dados da pesquisa (UFPB, 2013).

A partir da ferramenta “*menu analyse → histogram*”, obtém-se uma representação gráfica de quantos *pixels* possuem um determinado tom de cinza. Sua interpretação revela a qualidade de uma imagem em relação ao contraste e ao brilho. A modificação de um histograma modifica a imagem, visto que sua intensidade será modificada, podendo realçar detalhes de interesse, pois os níveis de cinza presentes em uma imagem podem ser facilmente modificados para realçar a interpretação visual da imagem. Como visto na figura 18, os tons de cinza podem variar de 0 (preto) a 255 (branco). Tons de cinza baixos serão percebidos como uma imagem escura e com baixo brilho. Neste histograma, pode-se observar que os tons de cinza se aproximam de 255, significando uma imagem clara e com alto brilho.

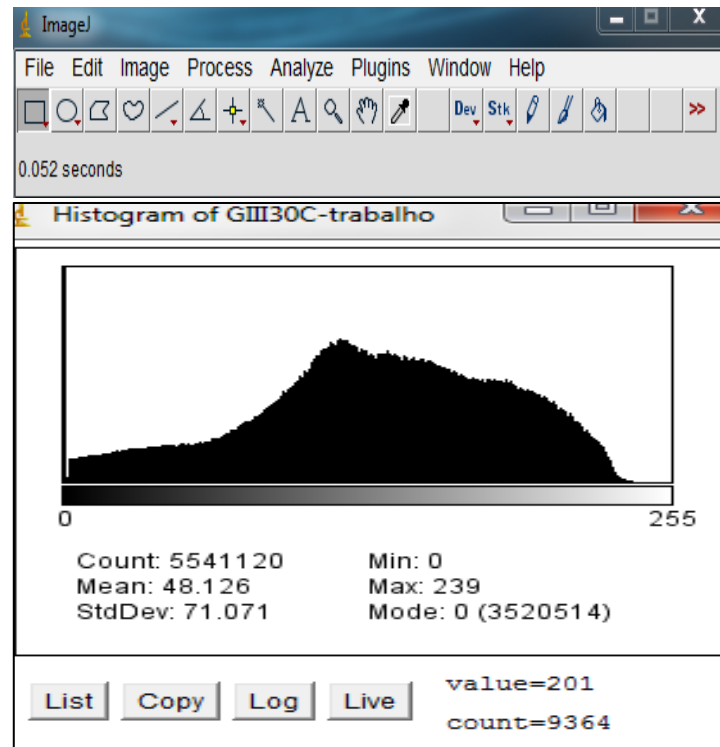


Fig. 18 - Histograma obtido a partir da imagem de um defeito ósseo controle. Observa-se que os dados da imagem não foram perdidos, visto que os valores estão entre 0 e 255. O eixo horizontal determina os tons de cinza e o vertical a probabilidade de ocorrência de tons de cinza na imagem. **Fonte:** Dados da pesquisa (UFPB, 2013).

O ícone “*Analyse → Set Measurements*” permite a obtenção das medidas do preenchimento do defeito ósseo. Inicialmente, com auxílio do *mouse*, a circunferência total de cada defeito ósseo é delimitada por um círculo (em amarelo) (Figuras 19A, 19B e 19C). Em seguida, o *Image J®* automaticamente atribui o valor da correspondente à área de neoformação óssea, a partir dos tons de cinza da área delimitada.

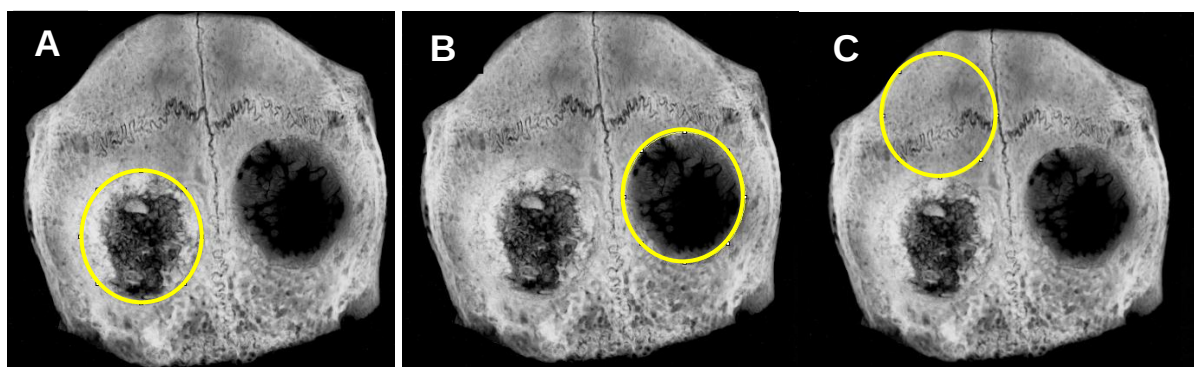


Fig. 19: Imagem dos defeitos ósseos selecionados (círculo amarelo) para obtenção das medidas do reparo ósseo. **A)** defeito experimental; **B)** defeito controle; e **C)** porção superior da calvária em que o osso não foi manipulado. **Fonte:** Dados da pesquisa (UFPB, 2013).

Os valores obtidos correspondentes ao preenchimento ósseo de cada área selecionada foram arquivados e transferidos para o programa Microsoft Excel®. Para se obter o percentual de reparo, cada valor obtido nos defeitos experimental e controle foi dividido pelo valor do osso que não foi manipulado e multiplicado por 100 (equação abaixo).

$$\text{Percentual de reparo ósseo} = \frac{\text{Intensidade do nível de cinza da cavidade experimental ou controle}}{\text{Intensidade do nível de cinza da região do osso da calvária que não foi manipulada}} \times 100$$

Como ilustrado na figura 20, é possível observar que a média de reparo do defeito experimental (1) foi de 105,424, o do osso que não foi manipulado (2) de 126,100 e do defeito controle (3) de 67,810. Assim, neste exemplo, o percentual de reparo no defeito experimental foi de 83,60%, enquanto no controle a neoformação óssea foi de 53,77%.

	A	B	C	D	E	F	G
1		Area	Mean	Min	Max		
2	1	78.800	105.424	0	234		
3	2	78.800	126.100	0	214		
4	3	78.800	67.810	0	231		
5							
6							

Figura 20: Planilha do Programa Excel® contendo os valores da área do defeito e a média de reparo: 1- cavidade experimental; 2- tecido ósseo não manipulado; 3- cavidade controle.

Fonte: Dados da pesquisa (UFPB, 2013).

A partir daí, os valores percentuais obtidos foram submetidos à análise estatística para avaliação do reparo ósseo inter e intragrupos.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Cada imagem radiomicrográfica foi submetida a duas avaliações para a obtenção da média. Os dados foram registrados na forma de banco de dados do programa de informática SPSS® Statistics para Windows, versão 20.0, e analisados por meio de estatística descritiva e inferencial. Para os procedimentos descritivos,

foram apresentadas medidas de tendência central (média) e de variabilidade (desvio-padrão e intervalos de confiança). Os procedimentos de inferência estatística, por sua vez, foram realizados por meio dos testes t de *Student* para amostras independentes e pareadas, para identificar as diferenças entre grupos, foi realizada a Análise de Variância (com teste *post hoc* de Tukey), que identifica diferenças entre os grupos. Ressalta-se que a escolha por testes paramétricos foi pautada na observância da distribuição dos dados, corroborado pelo teste de normalidade de Komogorov-Smirnov, que apontou para uma distribuição normal ($p > 0,05$). Para a interpretação das informações, foi adotado um intervalo de confiança de 95%, e nível de significância de 5% ($p < 0,05$).



Resultados

5 RESULTADOS

Os resultados foram encontrados a partir de 80 imagens obtidas através de radiomicrografias realizadas nos lados controle e experimental nos períodos de 30 e 60 dias. Considerando-se que este estudo teve o escopo de comparar o percentual de reparação óssea em defeitos produzidos na calvária de coelhos, tanto em função das substâncias e concentrações utilizadas (comparação intergrupos), quanto em função da manipulação dos grupos controle e experimental (comparação intragrupos), os resultados foram apresentados separadamente, para fins de melhor apresentação das informações.

5.1 COMPARAÇÃO INTRAGRUPOS (EXPERIMENTAL X RESPECTIVO CONTROLE)

5.1.1 Grupo I (Bio-Oss®)

Os resultados estatísticos referentes ao reparo ósseo no GI estão descritos na tabela 01.

Período de 30 dias: o percentual médio de reparo nos defeitos ósseos preenchidos com o Bio-Oss® foi de 61,91%, enquanto o controle correspondente foi de 38,97%, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,04$).

Período de 60 dias: o percentual médio de reparo nos defeitos ósseos preenchidos com o Bio-Oss® foi de 83,23%, enquanto o controle correspondente foi de 44,80%. Por meio do teste “t” de *Student* observa-se que esta diferença é estatisticamente significativa ($p=0,02$).

Pode-se observar também que na cavidade experimental houve um aumento da neoformação óssea entre 30 dias e 60 dias, estatisticamente significativo ($p=0,05$), pois o percentual de reparo passou de 61,91 para 83,23%. Por outro lado, no lado controle (coágulo sanguíneo), o reparo ósseo progrediu de 38,97% (observado aos 30 dias) para 44,80% (aos 60 dias). Esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,36$).

O maior percentual de neoformação óssea nos defeitos experimentais aos 30 e 60 dias mostra que o Bio-Oss® acelerou o processo de reparo quando comparado ao coágulo sanguíneo.

Tabela 1 - Percentual de reparo ósseo em defeitos na calvária de coelhos nos períodos de 30 e 60 dias - G1 – (Bio-Oss®).

GRUPO	PERÍODO (dias)	EXPERIMENTAL (%)		CONTROLE (%)		t (p)
		M ± DP	IC 95%	M ± DP	IC 95%	
G1 Bio-Oss®	30	61,91	45,02-78,79	38,97	24,99-52,94	3,21
		±10,61		±8,78		(0,04)*
	60	83,23	60,26-106,20	44,80	32,06-57,54	4,57
		±14,43		±8,00		(0,02)*
	t (p)	2,38 (0,05)*		0,98 (0,36)		5,21 (0,01)*

M = Média; DP= Desvio Padrão; IC= Intervalo de Confiança; p=probabilidade de erro.

*=apresenta diferença estatisticamente significativa para $p \leq 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa (UFPB, 2013).

5.1.2 Grupo II (Bio-Oss® + ALN 0,5%)

Os resultados estatísticos referentes ao reparo ósseo no GII estão descritos na tabela 02.

Período de 30 dias: O percentual médio de neoformação óssea nos defeitos ósseos preenchidos com o Bio-Oss® + ALN 0,5% foi 80,39%, enquanto o controle correspondente foi de 37,86%. Através do teste t de *Student* foi demonstrado que essa diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0,002$).

Período de 60 dias: O percentual de reparo ósseo nos defeitos ósseos que foram preenchidos com Bio-Oss® + ALN 0,5% foi de 98,72%, enquanto o controle correspondente foi de 36,19%. Por meio do teste “t” de *Student* observa-se que esta diferença é estatisticamente significativa ($p=0,001$).

Observa-se que no lado experimental o aumento da neoformação óssea foi estatisticamente significativo entre 30 dias e 60 dias ($p=0,007$), pois o percentual de reparo passou de 80,39% para 98,72%. Por outro lado, no respectivo controle

(coágulo sanguíneo), o reparo ósseo foi de 37,86% aos 30 dias e de 36,19% aos 60 dias, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,67$).

O maior percentual de neoformação óssea nos defeitos experimentais aos 30 e 60 dias mostra que o Bio-Oss® associado ao ALN 0,5% acelerou o processo de reparo quando comparado ao coágulo sanguíneo e que esse foi significativamente maior aos 60 dias.

Tabela 2 - Percentual de reparo ósseo em defeitos na calvária de coelhos nos períodos de 30 e 60 dias - Grupo II- (Bio-Oss® +ALN 0,5%).

GRUPO	PERÍODO (dias)	EXPERIMENTAL (%)		CONTROLE (%)		t (p)
		M ± DP	IC 95%	M ± DP	IC 95%	
G2 Bio-Oss+ ALN 0,5%	30	80,39	66,57	37,86	34,60	10,73 (0,002)*
		±8,68	±94,21	±2,04	±41,11	
	60	98,72	94,67	36,19	24,67	12,96 (0,001)*
		±2,54	±102,77	±7,24	±47,71	
	t (p)	4,05 (0,007)*		0,44 (0,67)		11,04 (<0,001)*

M = Média; DP= Desvio Padrão; IC= Intervalo de Confiança; p=probabilidade de erro.

*=apresenta diferença estatisticamente significativa para $p\leq0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa (UFPB, 2013).

5.1.3 Grupo III (Bio-Oss® +ALN 1%)

Os resultados estatísticos referentes ao reparo ósseo no GIII estão descritos na tabela 03.

Período de 30 dias: o percentual médio de reparo ósseo nos defeitos preenchidos Bio-Oss® + ALN 1% foi de 81,60% e o controle correspondente de 45,42%, essa diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,01$).

Período de 60 dias: O percentual de reparo dos defeitos preenchidos Bio-Oss® +ALN 1% foi de 92,66% e do grupo controle 41,71%. Por meio do teste t de *Student*, observa-se que essa diferença é estatisticamente significativa ($p=0,04$).

Nesse grupo, na cavidade experimental houve um aumento da neoformação óssea entre 30 dias e 60 dias, estatisticamente significativo ($p=0,08$), o percentual de reparo passou de 81,60 para 92,66%. No grupo controle (coágulo sanguíneo), por

sua vez, o reparo ósseo aos 30 dias foi de 45,42%, e de 41,71% aos 60 dias. Esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,50$).

O maior percentual de reparo ósseo nos defeitos experimentais aos 30 e 60 dias mostra que o Bio-Oss®+ALN 1% acelerou o processo de reparo quando comparado ao coágulo sanguíneo.

Tabela 3 - Percentual de reparo ósseo em defeitos na calvária de coelhos nos períodos de 30 e 60 dias - Grupo III – (Bio-Oss® +ALN 1%).

GRUPO	PERÍODO (dias)	EXPERIMENTAL (%)		CONTROLE (%)		t (p)
		M ± DP	IC 95%	M ± DP	IC 95%	
GIII Bio-Oss+ ALN 1,0%	30	81,60	72,96-90,23	45,42	30,56-60,27	5,78
		±5,42		±9,33		(0,01)*
	60	92,66	77,97-107,34	41,71	35,95-47,46	8,10
		±9,22		±3,61		(0,04)*
	t (p)	2,06 (0,08)*		0,74 (0,50)		8,77 (<0,001)

M = Média; DP= Desvio Padrão; IC= Intervalo de Confiança; p=probabilidade de erro.

*=apresenta diferença estatisticamente significativa para $p \leq 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa (UFPB, 2013).

5.1.4 Grupo IV (ALN 0,5%)

Os resultados estatísticos referentes ao reparo ósseo no GIV estão descritos na tabela 04.

Período de 30 dias: o percentual de reparo ósseo dos defeitos preenchidos com ALN 0,5% foi de 48,45%, enquanto o controle correspondente foi de 43,65%, não demonstrando diferença estatisticamente significativa ($p= 0,23$).

Período de 60 dias: o percentual de reparo dos defeitos preenchidos com ALN 0,5% aumentou para 50,18%, e o controle para 51,77%. Esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,80$).

Diante desse resultado, observa-se que na cavidade experimental I não houve aumento estatisticamente significativo ($p=0,64$) da formação óssea entre 30 e 60 dias, visto que o percentual de reparo passou de 48,45% para 50,18%. No grupo

controle também foi demonstrado que o reparo progrediu de 43,65% para 51,77%, e que essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,22$).

Nesse grupo foi possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa com relação ao percentual de reparo ósseo nos defeitos experimentais preenchidos por ALN 0,5% e o controle (coágulo sanguíneo) nos períodos de observação.

Tabela 4 - Percentual de reparo ósseo em defeitos na calvária de coelhos nos períodos de 30 e 60 dias - Grupo IV (ALN 0,5%).

GRUPO	PERÍODO (dias)	EXPERIMENTAL (%)				CONTROLE (%)		t (p)
		M ± DP	IC 95%	M ± DP	IC 95%			
GIV ALN 0,5%	30	48,45	38,04-58,85	43,65	37,01-50,28	1,46		
		±6,54		±4,17		(0,23)		
	60	50,18	45,34-55,01	51,77	33,81-69,73	0,27		
		±3,03		±11,28		(0,80)		
	t (p)	0,47 (0,64)		1,35 (0,22)		0,47 (0,64)		

M = Média; DP= Desvio Padrão; IC= Intervalo de Confiança; p=probabilidade de erro.

Fonte: Dados da pesquisa (UFPB, 2013).

5.1.5 Grupo V (ALN 1%)

Os resultados estatísticos referentes ao reparo ósseo no GV estão descritos na tabela 05.

Tabela 5 - Percentual de reparo ósseo em defeitos na calvária de coelhos nos períodos de 30 e 60 dias - Grupo V (ALN 1%).

GRUPO	PERÍODO (dias)	EXPERIMENTAL (%)		CONTROLE (%)		t (p)
		M ± DP	IC 95%	M ± DP	IC 95%	
GV ALN 1,0%	30	41,45	27,15-55,75	48,50±	36,57-60,43	0,86
		±8,98		7,49		(0,44)
	60	37,46	27,48-47,43	43,15±	27,10-59,20	1,01
		±6,26		10,08		(0,38)
	t (p)	0,72 (0,49)		0,85 (0,42)		1,39 (0,20)

M = Média; DP= Desvio Padrão; IC= Intervalo de Confiança; p=probabilidade de erro.

Fonte: Dados da pesquisa (UFPB, 2013).

Período de 30 dias: o percentual médio de neoformação óssea nos defeitos preenchidos com o ALN a 1% foi de 41,45%, enquanto o controle correspondente foi de 48,50%. Através do teste t de *Student* essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,44$).

Período de 60 dias: o percentual médio de reparo nos defeitos preenchidos ALN a 1% foi de 37,46%, enquanto o controle corresponde foi de 43,15%, demonstrando que não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,38$).

Pode-se observar que no lado experimental não houve aumento estatisticamente significativo ($p=0,49$) da neoformação óssea entre 30 e 60 dias, pois o percentual de reparo inicial foi de 41,45% e aos 60 dias de 37,46%. No grupo controle (coágulo sanguíneo), foi observado um reparo ósseo de 48,50% aos 30 dias e de 43,15% aos 60 dias, sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,42$).

As estatísticas descritivas e inferenciais estão pormenorizadas na Tabela 6 e representadas graficamente nos gráficos 1, 2 e 3 que mostram o percentual de reparo ósseo, comparando os grupos estudados (experimental X controle), nos respectivos tempos de observação. Os maiores percentuais de reparo ósseo foram encontrados nos grupos experimentais, principalmente quando o ALN 0,5 ou 1% foi associado ao osso bovino liofilizado (GII e GIII); no GV, o lado controle reparou mais do que o experimental, possivelmente devido à concentração do ALN utilizada. Foi demonstrado que o maior percentual de reparo ocorreu nos grupos II e III, principalmente quando comparados aos grupos IV e V.

5.2 COMPARAÇÃO INTERGRUPOS

Conforme antecipa a tabela 6, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no lado experimental, ao passo que tais diferenças não existiram no lado controle. A ausência de diferenças no lado controle, portanto, sugeriu que esse apresentou parâmetro equivalente para todos os grupos.

No tocante ao lado experimental, considerando que a ANOVA apontou diferenças entre os grupos, foram realizadas comparações emparelhadas pelo teste *post hoc* de Tukey.

Tabela 6 – Comparação do percentual (média e desvio-padrão) de neoformação óssea nos defeitos de calvária de coelhos, intra e intergrupos.

Grupos	Período (dias)	Experimental (%)		Controle (%)		t (p)
		M ±DP	IC 95%	M ±DP	IC 95%	
GI Bio-Oss®	30	61,91 ± 10,61 abc	45,02 – 78,79	38,97 ± 8,78	24,99 – 52,94	3,21 (0,04)*
	60	83,23 ± 14,43 AB	60,26 – 106,20	44,80 ± 8,00	32,06 – 57,54	4,57 (0,02)*
	t (p)	2,38 (0,05)*		0,98 (0,36)		5,21 (0,01)*
GII Bio-Oss® + ALN 0,5%	30	80,39 ± 8,68 ade	66,57 – 94,21	37,86 ± 2,04	34,60 – 41,11	10,73 (0,002)*
	60	98,72 ± 2,54 CD	94,67 – 102,77	36,19 ± 7,24	24,67 – 47,71	12,96 (0,001)*
	t (p)	4,05 (0,007)*		0,44 (0,67)		11,04 (<0,001)*
GIII Bio-Oss® + ALN 1,0%	30	81,60 ± 5,42 bfg	72,96 – 90,23	45,42 ± 9,33	30,56 – 60,27	5,78 (0,01)*
	60	92,66 ± 9,22 EF	77,97 – 107,34	41,71 ± 3,61	35,95 – 47,46	8,10 (0,004)*
	t (p)	2,06 (0,08)		0,74 (0,50)		8,77 (<0,001)*
GIV ALN 0,5%	30	48,45 ± 6,54 df	38,04 – 58,85	43,65 ± 4,17	37,01 – 50,28	1,46 (0,23)
	60	50,18 ± 3,03 ACE	45,34 – 55,01	51,77 ± 11,28	33,81 – 69,73	0,27 (0,80)
	t (p)	0,47 (0,64)		1,35 (0,22)		0,47 (0,64)
GV ALN 1,0%	30	41,45 ± 8,98 ceg	27,15 – 55,75	48,50 ± 7,49	36,57 – 60,43	0,86 (0,44)
	60	37,46 ± 6,26 BDF	27,48 – 47,43	43,15 ± 10,08	27,10 – 59,20	1,01 (0,38)
	t (p)	0,72 (0,49)		0,85 (0,42)		1,39 (0,20)
Estatística Inferencial	30	F=19,43 (<0,001)*		F=1,63 (0,21)		4,05 (0,01)*
	60	F=42,11 (<0,001)*		F=1,76 (0,18)		4,23 (<0,001)*

M = Média; DP= Desvio Padrão; IC= Intervalo de Confiança; p=probabilidade de erro.

*=apresenta diferença estatisticamente significativa para $p \leq 0,05$. Letras minúsculas iguais sugerem diferenças entre os grupos após 30 dias. Letras maiúsculas sugerem diferenças entre os grupos após 60 dias, conforme teste *post hoc* de Tukey.

Fonte: dados da pesquisa (UFPB, 2013).

Período de 30 dias (Tabela 06, Gráfico 01): verificou-se que no GI (Bio-Oss®) o percentual de reparo foi de 61,91% ao passo em que no grupo em que ao Bio-Oss® foi adicionado o ALN 0,5% (GII) esse percentual aumentou para 80,39%, sendo esta

diferença estatisticamente significativa entre estes grupos; quando o ALN a 1% (GIII) foi acrescentado ao Bio-Oss®, o percentual de reparo aumentou para 81,60%, sendo estatisticamente significativa esta diferença em relação ao grupo em que o Bio-Oss® foi utilizado isoladamente; entretanto, o aumento da concentração do ALN de 0,5 (80,39%) para 1% (81,60%) associado ao Bio-Oss® não elevou de forma estatisticamente significativa o percentual de reparo.

Quando o ALN foi utilizado isoladamente e na concentração de 0,5% (GIV), o percentual de reparo foi de 48,45%, em comparação com o Bio-Oss® (GI) inserido isoladamente que reparou 61,91%. Apesar da diferença entre estes grupos ter sido de 13,50% essa diferença não foi estatisticamente significativa. Na comparação entre o ALN 1% (41,45%) com o GI (61,91%), a diferença entre os dois foi de 20,46%, demonstrando diferença estatisticamente significativa. Os grupos GIV (48,45%) e GV (41,45%) mostraram menores percentuais de reparo quando comparados aos demais, no entanto não houve diferença significativa entre os mesmos apesar do grupo que utilizou menor concentração ter apresentado maior percentual de reparo.

Período de 60 dias (Tabela 06, Gráfico 02): os resultados foram proporcionalmente semelhantes ao período de 30 dias. Quando o Bio-Oss® (GI) foi utilizado isoladamente o percentual de reparo foi de 83,23%, ao passo em que a adição do ALN a 0,5% (GII) elevou o reparo para 98,72%. Apesar desta associação ter aumentado o percentual de reparo em 15,49% e apresentar significância clínica, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Ao ser elevada a concentração de ALN para 1% associada ao Bio-Oss® (GIII), o percentual de reparo foi de 92,66%, demonstrando que houve aumento no percentual de reparo de 9,43% em comparação com o Bio-Oss® isoladamente (GI) e que a concentração mais elevada diminuiu o percentual de reparo, no entanto essa diferença não foi significativa estatisticamente em relação ao GI e GII.

No grupo em que o ALN foi utilizado de forma isolada e na concentração de 0,5%, o percentual de reparo foi de 50,18%, indicando que o reparo ósseo nesse grupo foi significativamente menor em relação aos grupos nos quais foi utilizado o osso bovino de forma isolada (83,23% de neoformação óssea) e associado ao ALN a 0,5 (98,72%) ou 1% (92,66%). No uso isolado de ALN 1% nos defeitos ósseos,

houve redução do percentual de neoformação óssea para 37,45%, resultados próximos aos encontrados no GIV (ALN 0,5%), demonstrando que não houve diferença significativa entre esses grupos, mas que os mesmos diferiram significativamente em relação aos grupos I, II e III. Portanto, o percentual de reparo nesse período de observação (60 dias) também foi significativamente maior para os grupos II e III. Demonstrando, que a adição do ALN nas duas concentrações (0,5 e 1%) ao Bio-Oss® elevam o percentual de reparo de defeitos ósseos em calvárias de coelhos.

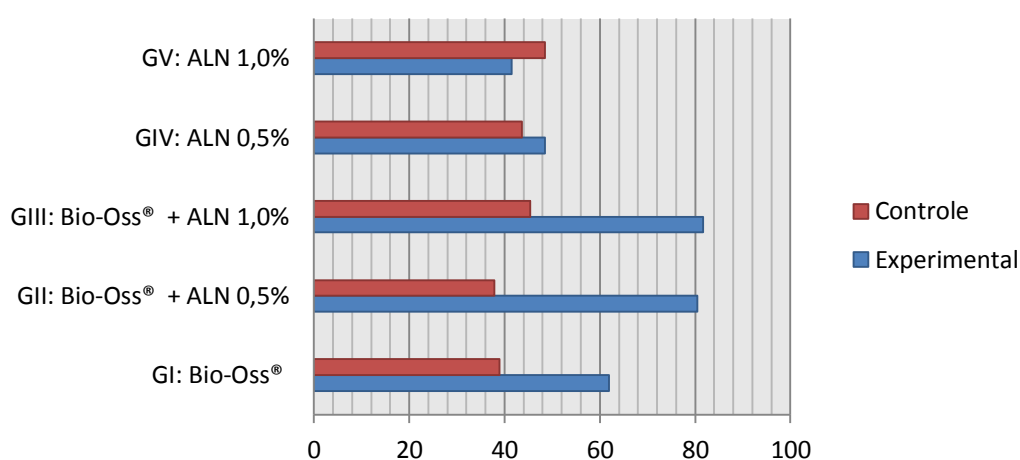


Gráfico 1 - Percentual médio de reparação óssea em defeito confeccionado em calvária de coelhos no lado experimental, aos 30 dias.

Fonte: dados da pesquisa (UFPB, 2013).

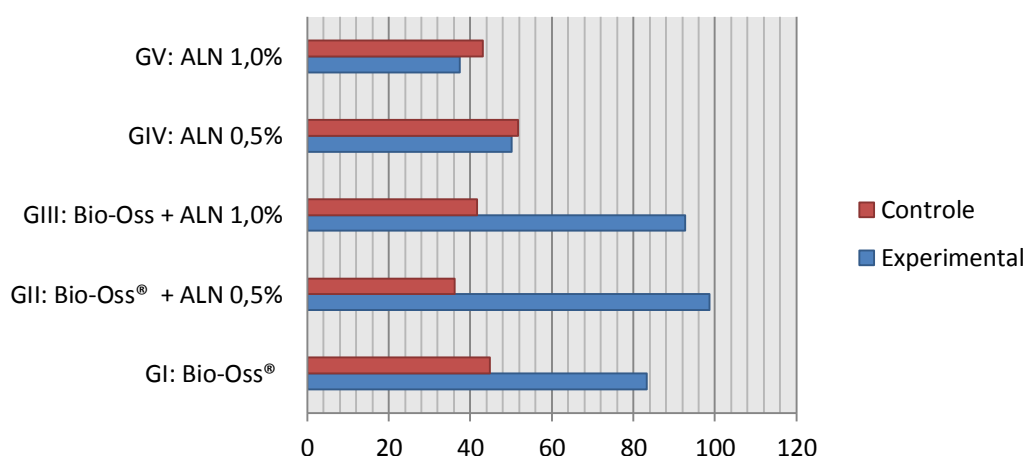


Gráfico 2 - Percentual médio de reparação óssea em defeito produzido em calvária de coelhos no lado experimental aos 60 dias.

Fonte: Dados da pesquisa (UFPB, 2013).

O gráfico 3 fornece o valor médio do reparo ósseo e quanto os seus dados variaram, demonstrando que os grupos GII e GIII, apresentaram o maior valor central, pois o percentual de reparo médio foi de mais de 80%, sendo o maior de todos os grupos, no entanto os grupos GIV e GV, foram os que apresentaram menor valor central de reparo, com o percentual abaixo de 60%. Quando foi avaliado o quanto os dados variaram, o gráfico1 demonstra que no grupo GIV os percentuais de reparo não variaram muito e ficaram em torno de 45 e 50%. Já o GI foi o que apresentou maior variabilidade, no qual os valores oscilaram entre 60 e 80% (20% de variabilidade).

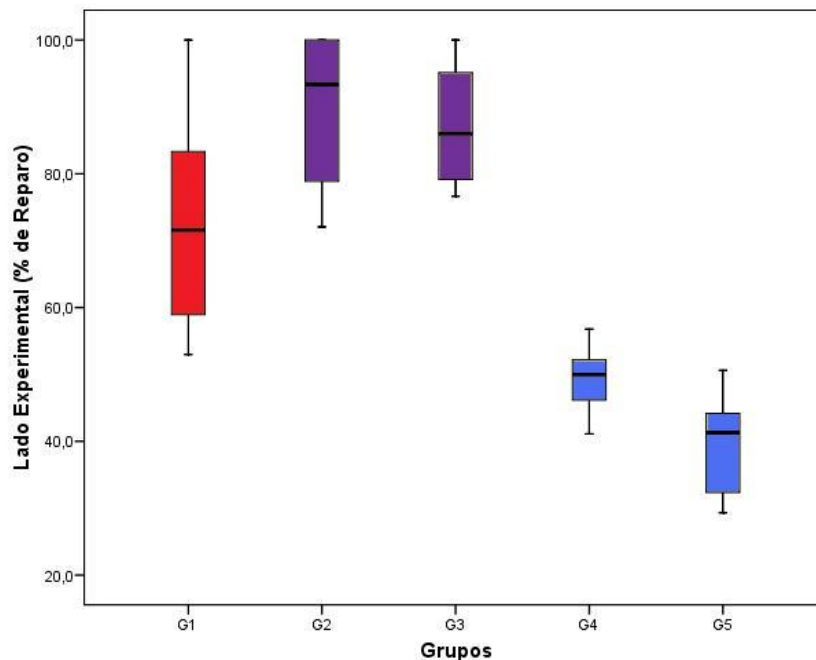


Gráfico 3 - Valor médio do percentual de reparo ósseo dos defeitos confeccionados em calvária de coelhos no lado experimental.

Fonte: Dados da pesquisa (UFPB, 2013).



Discussão

6 DISCUSSÃO

Várias pesquisas têm utilizado o coelho como modelo experimental para avaliar processo de reparo ósseo (FERNANDES; FAIG-LEITE; CARVALHO, 2004; GORDJESTANI et al., 2006; VON KNOCK et al., 2007; OMI et al., 2007; BODDE et al., 2008; ABBASPOUR et al., 2009; HOFSTAETTER et al., 2010; ZHU et al., 2010). Essa escolha é devida à facilidade de manipulação, baixo custo e anatomia da calvária que, em virtude de seu volume, permite a realização de dois defeitos de 10 mm de diâmetro. Por apresentar metabolismo três a quatro vezes mais acelerado do que o do ser humano, a maior parte do remodelamento osteogênico em coelhos ocorre entre as primeiras seis e oito semanas pós-cirurgia. O período de observação estabelecido de 30 e 60 dias baseou-se nesses dados. Este último é considerado um período ideal para avaliar a formação óssea em coelhos e equivale a um período de cerca de 180 dias (seis meses) em humanos (VASCONCELOS et al., 2006).

A confecção de defeitos ósseos em calvária de coelhos com auxílio da broca trefina teve sua indicação no presente estudo principalmente devido à facilidade de padronização do diâmetro das cavidades (ALTUNDAL; GURSOY, 2005; FERNANDES, 2005; JAIME et al., 2005). Estudos realizados em calvária de coelhos têm demonstrado que um defeito ósseo de 10 mm de diâmetro é considerado crítico (GORDJESTANI et al., 2006; AMARAL, 2007). Defeitos ósseos críticos não permitem regeneração óssea espontânea, por esse motivo são preconizados quando se pretende investigar o grau de reparo ósseo em estudos experimentais, pois permite avaliar o potencial osteogênico da substância estudada (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

A via de administração e a dosagem do ALN são dois fatores importantes para elucidar a ação desse medicamento na reabsorção óssea (MANALOGAS, 2000). Omi et al. (2007) evidenciaram que o ALN injetado localmente e em baixas doses aumentou significativamente a densidade óssea mineral. Esses resultados assemelham-se aos relatados por Srisubut et al. (2007) que, avaliando o efeito anabólico do ALN local associado ao vidro bioativo, demonstraram que uma simples dose melhora a formação óssea. Desta forma, no presente estudo, o ALN foi

aplicado localmente, apenas uma dose e em duas concentrações diferentes 0,5 e 1%.

A relação entre o uso do ALN pela via sistêmica e o processo de reparo ósseo tem sido objeto de estudo de muitos pesquisadores. Machado et al. (2006) observaram que a adição diária desse medicamento na água de beber mostrou efeito positivo no processo de reparo ósseo de tíbias de ratas ovariectomizadas. Os autores testaram diferentes concentrações (0,25; 0,5; e 0,75 mg/kg) concluindo que sua ação é dose dependente. Altundal et al. (2005) também observaram que após preenchimento de defeito ósseo com enxerto autógeno e administração de ALN (0,25mg/kg/dia) por via subcutânea aumentou a formação óssea. Aguirre et al. (2010) e Altundal e Güvener (2005) nos experimentos de reparo alveolar pós-extração em ratos, utilizando ALN subcutaneamente, verificaram aumento do volume ósseo alveolar e supressão pronunciada da reabsorção óssea. Graziani et al. (2008), observaram em 40 pacientes submetidos à cirurgia de extração de terceiros molares que receberam doses semanais subcutâneas de 70mg de ALN por 4 meses, que o reparo intra-alveolar também foi mais rápido. Estes resultados não estão de acordo com os observados por Yaffe et al. (2003a) que investigaram o efeito do ALN em implantes ectópicos, e demonstraram que o ALN na concentração de 0,5 mg/kg, por via endovenosa foi efetivo na redução da reabsorção óssea, no entanto não aumentou a quantidade ou densidade óssea. Resultados semelhantes aos observados por Iwata et al. (2006) que avaliaram a ação do ALN (0,1; 1,0 e 10 µg/kg/dia) na formação óssea, por via subcutânea e demonstraram efeito direto na atividade osteoblástica com supressão da formação óssea.

Muitos estudos mostram efeitos semelhantes do ALN local e sistêmico na diminuição da reabsorção óssea (KAWATA et al., 2004) e na melhora do reparo ósseo com aumento da densidade óssea mineral (Omi et al., 2007). Killeen et al. (2012) constataram que o ALN administrado sistemicamente e por curto período de tempo, promoveu aumento da espessura óssea maior do que no uso tópico da droga, concordando com os estudos de Yaffe et al. (1995) nos quais não houve diferença estatisticamente significativa na inibição da reabsorção óssea entre o grupo controle e o testado, quando da aplicação local do ALN, enquanto que a administração sistêmica reduziu significativamente a reabsorção óssea. Resultados diferentes foram encontrados por Toker et al. (2012), que demonstraram que o ALN

1mg/ml por 5 minutos e aplicado localmente aumentou a neoformação óssea em enxertos autógenos em comparação ao grupo que recebeu o ALN sistemicamente na dose de 0,01mg/kg/dia.

Visando minimizar os efeitos colaterais como esofagite, erosões e ulcerações, reações observadas quando da administração sistêmica do ALN (FLEISCH, 1998), o número de estudos para avaliar a ação e efetividade de sua aplicação tópica tem sido cada vez mais crescente. Parte-se do princípio de que a aplicação local do medicamento evita a maioria desses efeitos, tendo ainda como vantagem a obtenção de uma concentração local maior do que a adquirida através da aplicação sistêmica (YAFFE et al., 1997; MERAW; REEVE; WOLLAN, 1999; LEVIN et al., 2001; ASPENBERG; ASTRAND, 2002; YAFFE et al., 2003a; KAWATA et al., 2004; FERNANDES; FAIG-LEITE; CARVALHO, 2004; SHARMA; PRADEEP, 2012 ; TOKER et al., 2012).

A ação local do ALN sobre a reabsorção óssea foi primeiramente descrita por Yaffe et al. (1995) que inicialmente observaram que o ALN nas concentrações de 0,15; 0,75 e 1,5 mg não inibiu a reabsorção óssea ocasionada pela elevação de retalho mucoperiosteal. Dois anos após, Yaffe et al. (1997) aumentaram a dose para 20mg e observaram redução estatisticamente significativa da reabsorção óssea alveolar. Yaffe et al. (1999) também usaram esponja de gelatina embebida (10µl) de ALN no osso alveolar e demonstrou absorção local e sistêmica da droga, como também efeito na prevenção da reabsorção óssea. Jaime et al (2005) avaliaram o efeito tópico do ALN em esponja de colágeno, em defeitos cirúrgicos, e não encontraram diferenças entre o grupo tratado e o placebo, resultados semelhantes aos relatados de Yaffe et al. (1995). Entretanto, Binderman e Yaffe (2000) utilizaram esponja de gelatina embebida em solução de ALN (10, 50, 200 e 400 µg) e demonstram efeito positivo na aplicação tópica e dose dependente, com redução significativa da perda óssea alveolar. Resultados favoráveis quanto ao reparo ósseo, foram observados por Komatsu et al. (2008) nos quais o ALN 1mM aplicado topicamente reduziu de forma estatisticamente significativa a reabsorção óssea e radicular e estimulou a formação de osso ao redor de dentes reimplantados.

No intuito de viabilizar a aplicação local do ALN pesquisas têm sido realizadas para avaliar a ação dessa substância na forma de gel. Sharma e Pradeep (2012a)

demonstraram a eficácia da aplicação local de 10µl de gel de ALN a 1% (10mg/ml) em pacientes com doença periodontal agressiva, constatando que houve melhora do preenchimento ósseo. Resultados semelhantes foram observados por Veena e Prasad (2010), quando demonstraram, através de análise clínica e radiográfica, que o ALN aplicado localmente e na forma gel (0,1ml) foi efetivo no tratamento da periodontite associada à perda óssea. Do mesmo modo, nos relatos de Reddy, Kumar e Veena (2005), seguindo a mesma linha de pesquisa, utilizaram ALN 1% na forma de gel e observaram redução na reabsorção e aumento na formação óssea em cirurgias periodontais.

Análises por imagem radiográfica e tomográfica têm sido empregadas para avaliar o processo de reparo, reabsorção ou neoformação óssea tanto em humanos como em animais (OMI et al., 2007; KOMATSU et al., 2008; GRAZIANI et al., 2008; BODDE et al., 2008; ABBASPOUR et al., 2009; COTTRELL et al., 2010; ABTAHI; TENGVALLI; ASPENBERG, 2010; VEENA; PRASAD, 2010; HOFSTAETTER et al., 2010; GILL; GUPTA; SIKRI, 2011; SHARMA; PRADEEP, 2012). Alguns pesquisadores empregaram técnica de avaliação radiomicrográfica semelhante à utilizada no presente estudo (YAFFE et al., 1995; BINDERMAN; ADUT; YAFFE, 2000; YAFFE et al., 2003a; YAFFE et al., 2003b). Yaffe et al. (2003a) relataram que as estimativas radiomicrográficas obtidas a partir dos níveis de cinza da imagem dos defeitos ósseos corresponderam aos achados histomorfométricos.

Na presente pesquisa, nas cavidades em que o Bio-Oss® foi inserido tanto isoladamente (GI), bem como associado ao ALN a 0,5 e 1%, o percentual de neoformação óssea obtido a partir de imagens radiomicrográficas foi maior quando comparado ao coágulo sanguíneo, sendo esta diferença estatisticamente significativa, tanto aos 30 quanto aos 60 dias. Estes achados corroboram os relatos da literatura sobre a efetividade e o sucesso clínico do Bio-Oss® como material substituto ósseo (ZAMBUZZI et al., 2006; SCHLEGEL; FUCHTNER; SHULTZ-MOSGAU, 2003; ESPOSITO et al., 2006).

As concentrações de 0,5% (5mg/ml) e 1% (10mg/ml), utilizadas na presente pesquisa, foram definidas com base na literatura, sendo aplicada apenas 0,15ml nas cavidades experimentais, ou seja, 0,75 e 1,5 mg/ml das soluções de 0,5% e 1%, respectivamente. Nos estudos de Gomes (2006) sobre a citotoxicidade de diferentes

concentrações de ALN, os osteoblastos permaneceram viáveis quando as concentrações foram inferiores a 5mg/ml. Toker et al. (2012) observaram que 1mg/ml de ALN aplicado localmente por 5min em calvária de ratos promoveu aumento da atividade osteoblástica e da formação de novo osso nos enxertos autógenos. Sharma e Pradeep (2012a, b), observaram aumento na formação óssea em pacientes com doença periodontal em concentrações ainda menores (10 µl ALN 1% que equivale a 0,1mg/ml). Moreira et al. (2005) observaram que a pasta de ALN em polietilenoglicol (2mg/ml) mostrou-se altamente citotóxica, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Duas das concentrações pesquisadas por Yaffe et al. (1995), 0,75 e 1,5 mg/ml, foram semelhantes à do presente estudo e, a partir dos resultados obtidos por radiomicrografia de alta resolução, estes autores observaram que não houve diferença estatisticamente significativa na inibição da reabsorção do osso alveolar exposto entre o grupo controle e o testado.

Naidu et al. (2008), em seus estudos, observaram que o ALN em altas concentrações (10^{-4} mol/L) diminuiu significativamente a viabilidade celular e foi citotóxico; já baixas concentrações (10^{-6} mol/L) apresentaram benefícios terapêuticos, sem apresentar citotoxicidade. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por García-Moreno et al. (1998) nos quais nenhuma célula viável foi observada nas culturas que utilizaram concentrações superiores a 10^{-3} a 10^{-4} mol/L. Entretanto, Kawata et al. (2004) avaliando o efeito do ALN na diferenciação osteoclástica, observaram que a concentração de 10^{-4} M inibiu a reabsorção do enxerto ectópico em ratos (*in vivo*). Pode-se observar que estes estudos definiram as concentrações a partir da molaridade do ALN (Peso Molecular: 325,12 gramas por litro = 1 Molar). A conversão mol/L para mg/ml pode ser calculada pelas informações no anexo C. Considerando que 10^{-4} mol/L equivale a 0,00325 mg/ml, estas concentrações são bem mais diluídas do que as utilizadas no presente trabalho. Lustosa-Pereira et al. (2006) observaram que o uso tópico da solução de ALN 3,2 mg/L (equivalente a 0,0032mg/ml = 10^{-4} mol/L) reduziu de forma significativa a incidência de reabsorção radicular de dentes de ratos reimplantados, no entanto não impediu a anquilose dentária. Resultados semelhantes aos de Komatsu et al. (2008) nos quais o ALN 1mM aplicado topicamente reduziu de forma estatisticamente significativa a reabsorção óssea e radicular e estimulou a formação de osso ao redor de dentes reimplantados.

A concentração de ALN 1% na forma de gel, sem diluição, foi também testada nos estudos de Reddy, Kumar e Veena (2005) que observaram aumento na formação do osso em defeitos periodontais, e Pradeed et al. (2012) que exploraram a eficácia da aplicação local do gel de ALN em pacientes portadores de defeitos de furca grau II e constataram maior neoformação óssea.

A presente pesquisa detectou que, adicionando o ALN a 0,5% ao Bio-Oss® (GII), o percentual de reparo aumenta de forma estatisticamente significativa em relação ao enxerto de Bio-Oss® isolado (GI). Como pode ser observada na tabela 06, a média de percentual de neoformação óssea ao final do experimento perfaz 98,72%, o que significa reparo ósseo quase completo aos 60 dias. Apesar de não ter significância estatística em relação ao GI (83,23%), o ALN 1% associado ao Bio-Oss® (GIII) promoveu um percentual de reparo ósseo bastante expressivo (92,66%). A partir desta comparação, observa-se que a adição do ALN 0,5% ao Bio-Oss®, ou seja, em menor concentração, acelerou mais o reparo do que a adição do ALN 1%. Toker et al. (2012) encontraram resultados semelhantes no uso do tópico do ALN (1mg/ml), com aumento da neoformação óssea em calvária de ratos. Jaime et al. (2005), por sua vez, utilizando solução de ALN em concentrações mais altas (20 mg/ml) em defeito ósseo em calvária de ratos observaram escassa neoformação apenas nas bordas dos defeitos, sendo o restante preenchido por tecido conjuntivo fibroso. Estes achados podem ser explicados em virtude dos BFs apresentarem efeito bifásico: em baixas doses estimulam a proliferação celular e a formação de tecido osteóide, enquanto em altas concentrações o processo é inibido (COXON, THOMPSON, ROGERS, 2006).

O ALN pode não somente estimular os osteoblastos a secretarem inibidores da reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos, como também contribuir para a formação de precursores osteoblásticos e nódulos mineralizados, promovendo osteoblastogênese precoce, dependendo da dose utilizada (GIULIANI et al., 1998). Altundal et al. (2005), por meio de análises bioquímicas e histopatológicas, revelaram que esse medicamento além de efeito antirreabsortivo, exerce efeito na formação de novo osso e pode ser considerado como uma opção terapêutica para melhorar a formação óssea.

Buscando uma maior permanência das soluções de ALN aplicadas isoladamente nas cavidades experimentais e com objetivo de impedir a penetração de tecido conjuntivo na região do defeito ósseo, todos os defeitos ósseos foram forrados com membrana absorvível de cortical óssea bovina (ALMEIDA et al., 2000). Ao final do experimento, os grupos IV e V apresentaram menor percentual de reparo ósseo em relação aos seus respectivos controles, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Na análise por imagem radiomicrográfica, observa-se que o percentual de reparo ósseo do lado experimental no GIV (ALN 0,5%) aos 60 dias foi de 50,18%, maior que o percentual de reparo do GV (ALN 1,0% - 37,46%), reafirmando o mencionado anteriormente, que baixas concentrações do ALN aplicado localmente oferecem melhores condições para que o reparo ocorra mais rapidamente. No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Fato também observado na comparação entre GII e GIII, que não diferiram estatisticamente entre si (tabela 06).

Não foram encontrados outros estudos sobre a associação Bio-Oss®/ALN. Houshmand et al. (2007) investigaram a associação do Bio-Oss® a outro BF, o pamidronato de sódio, e observaram melhora na formação óssea devido ao aumento da percentagem de osso trabecular e diminuição significativa do número de osteoclastos no osso regenerado no reparo de defeitos ósseos confeccionados na mandíbula de ovelhas.

Outros estudos investigaram o ALN associado à HA, seja local ou sistemicamente. Estes estudos serão aqui discutidos uma vez que o Bio-Oss® é derivado da HA. Fernandes (2005) observou que o ALN local associado à HA interferiu negativamente, pois retardou a reparação óssea de defeitos cirúrgicos realizados em fêmures de ratos. Fernandes, Faig-Leite e Carvalho (2004), avaliando o reparo de defeitos ósseos com HA em coelhos que receberam ALN sistêmico (1mg/kg/dia/10dias), observaram que esta associação não interferiu na reparação óssea neste modelo experimental. Resultados semelhantes foram observados por Canettieri et al. (2009) que demonstrou que o ALN isolado e sua associação com HA apresentaram efeito nocivo no reparo de defeitos ósseos em ratos. Esses resultados não estão de acordo com os relatados por Gill, Gupta e Sikre (2011), quando

demonstraram que a associação desses potencializou a regeneração óssea em defeitos periodontais em humanos. Arslan et al. (2011) compararam o efeito da HA embebida em solução salina e em solução de ALN e observaram que neste último houve tendência a melhor formação óssea em defeitos de ratos osteoporóticos, mas sem significância estatística.

Há relatos de que ALN aumenta a fixação biomecânica e a quantidade de osso imaturo e maduro ao redor de implantes dentários (JAKOBSEN et al., 2009). Meraw, Reeve e Wollan (1999) demonstraram que nos implantes embebidos em 0,1Mmol ALN por uma semana houve aumento significativo do osso ao redor do implante. Jakobsen et al. (2006), demonstram que 15ml de uma solução de ALN 1mg/ml também aumentou a densidade óssea ao redor dos implantes. Em 2007, estes mesmos autores diminuíram a dose para 5 ml de uma solução de ALN (2mg\mL) e observaram elevação na osseointegração. Resultados semelhantes foram encontrados por Knock et al. (2007), que injetaram 1,0 mg/kg/semana de ALN para avaliar durabilidade de implantes dentários e observaram que houve aumento de osso ao redor dos mesmos. Resultados que contradizem os achados de Bodde et al. (2008) que evidenciaram, através da microtomografia, que a aplicação tópica do alendronato não elevou as condições ósseas locais e o contato osso implante. Esses resultados estão de acordo com os encontrados Xue e Haisheng et al. (2010) que avaliaram a influência do ALN (10 mg/kg/dia) na fixação da interface osso implante e observaram efeito limitado deste medicamento.

No presente estudo, a hipótese 0 (H_0) deve ser refutada, pois o osso bovino inorgânico, utilizado separadamente (GI), ou em associação ao ALN (GII e GIII), produziu percentuais de reparação maiores do que os encontrados no lado controle, estimulando o reparo ósseo. A hipótese 1 (H_1) deve ser confirmada, pois o ALN 0,5% associado ao osso bovino liofilizado (GII) acelerou o processo de reparo ósseo. Quando o ALN 1% foi associado ao osso bovino (GIII), o processo de reparo também foi acelerado, confirmando a hipótese 2 (H_2). A hipótese 3 (H_3) foi confirmada já que o ALN 0,5% associado ao osso bovino (GII) promoveu maior percentual de reparo ósseo ao final do experimento quando comparado ao ALN 1% associado ao osso bovino (GIII). A hipótese 4 (H_4) foi negada pois, apesar do ALN 0,5% isoladamente promover maior percentual de reparo que o ALN 1%, ambos retardaram o processo de reparo quando comparados aos respectivos controle.

Os promissores resultados encontrados na presente pesquisa decorrentes da adição do ALN ao osso bovino liofilizado (Bio-Oss®), a partir de avaliação radiomicrográfica dos defeitos ósseos, estimulam a realização de futuras pesquisas, de forma a testar o ALN topicamente em outras concentrações, em outros sítios ósseos, bem como utilizando outros métodos de avaliação como a análise histomorfométrica, no intuito de consolidar os achados e possibilitar sua utilização com segurança, objetivando melhoria dos resultados na prática clínica.



Conclusões

6 CONCLUSÕES

Buscando responder aos objetivos propostos, a partir da metodologia empregada e dos resultados obtidos, a presente pesquisa permite concluir que:

- a) A adição do ALN, nas concentrações de 0,5 e 1%, ao osso bovino inorgânico aplicado topicamente nos defeitos ósseos, acelerou o processo de reparo ósseo, quando comparado ao osso bovino inorgânico isoladamente;
- b) A adição do ALN 0,5% ao osso bovino inorgânico, aplicados topicamente nos defeitos ósseos, promoveu maior percentual de reparo ósseo do que na concentração de 1%;
- c) O ALN local, nas concentrações de 0,5% e 1%, aplicado isoladamente, retardou o processo de reparo ósseo, mas sem significância estatística.



Referências

REFERÊNCIAS⁴

- Abbaspour A, Takahashi M, Sairyo K, Takata S, Yukata K, Inui A et al. Optimal increase in bone mass by continuous local infusion of alendronate during distraction osteogenesis in rabbits. **Bone**. 2009 44(5):917-23.
- Aguirre JI, Altman MK, Vanegas SM, Franz SE, Bassit ACF, Wronski TJ. Oral effects of alendronate on bone healing after tooth extraction in rats. **Oral Dis**. 2010 Oct;16(7):674-85.
- Allori AC, Sillon AM, Warren SM. Biological basis of bone formation, remodeling, and repair – Part II: extracellular matrix. **Tissue Eng. Part B Rev**. 2008 Sep;14(3):275-83.
- Altundal H, Gursoy B. The influence of alendronate on bone formation after autogenous free bone grafting in rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2005 Mar;99(3):285-91.
- Altundal H, Sayrak H, Yurtsever E, Göker K. Inhibitory effect of alendronate on bone resorption autogenous free bone grafts in rats. **J Oral Maxillofac Surg**. 2007 Mar;65(3):508-16.
- Altundal H, Güvener O. The effect of alendronate on resorption of the alveolar bone following tooth extraction. **Int J Oral Maxillofac Surg**. 2004; 33: 286–293.
- Amaral JMBL. **Reparação óssea em cavidade cirúrgica preenchida com osso autógeno associado ao plasma rico em plaqueta e adesivo fibrínico. Análise histológica em crânios de coelhos**. [Dissertação] Bauru (SP) – Universidade do Sagrado Coração, 2007.
- Araújo JMS, Quintans TC, Santos SD, Sousa CD, Queiroga AS, Limeira Junior FA. Enxerto ósseo bovino como alternativa para cirurgias de levantamento de assoalho de seio maxilar. **Rev Cir Trauma Bucomaxilofac**. 2009;9:89-96.
- Arslan A, Altundal H, Cevik O, Olgac VY. Comparison of the effects of local application of hydroxyapatite graft soaked with alendronate solution and pure hydroxyapatite graft in the mandible of ovariectomized rats. **Biotechnol Biotechnol**. 2011;25(3):2513-21.
- Aspenberg P, Åstrand J. Bone allografts pretreated with a bisphosphonate are not resorbed. **Acta Orthop Scand**. 2002 Jan;73(1):20-3.
- Assael L. Oral Bisphosphonates as a Cause of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws: Clinical Findings, Assessment of Risks, and Preventive Strategies. **J Oral Maxillofac Surg** 2009 May;67(5 Suppl):35-43.

⁴ Normas de Padronização Bibliográfica seguindo os Requisitos Uniformes de Vancouver. Disponível em: http://www.fiocruz.br/bibsp/media/normas_bibensp.pdf e http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html. Acesso em 12.02.2013. Adaptação: as referências foram organizadas em ordem alfabética.

Aubin JE, Triffitti JT. **Mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation.** In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. Principles of bone biology. 2nd ed. Academic Press. San Diego, 2002. p. 59-81.

Barrios González E, Garcia Nieto V. Uso de bisfosfonatos en la infancia. **Bol Soc Canaria Pediatr.** 2005;29:7-12.

Benford HL, McGowan NWA, Helfrich MH, Nutall ME, Rogers MJ. Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3-activity in apoptotic osteoclasts in vitro. **Bone.** 2001 May;28(5):465-73.

Binderman I, Adut M, Yaffe A. Effectiveness of local delivery of alendronate in reducing alveolar bone loss following periodontal surgery in rats. **J Periodontol.** 2000 Aug;71(8):1236-40.

Bodde EWH, Kowalski RSZ, Spauwen PHM, Jansen JA. No Increased Bone Formation around Alendronate or Omeprazole Loaded Bioactive Bone Cements in a Femoral Defect. **Tissue Eng Part A.** 2008 Jan;14(1):29-39.

Boivin G, Meunier PJ. Effects of bisphosphonates on matrix mineralization. **J Musculoskelet Neuronal Interact.** 2002 Dec;2(6):538-43.

Brew MC, Figueiredo JAP. **Histologia geral para Odontologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2003. 148p.

Broulik PD, Rosenkrancová J, Růžicka P, Sedláček R. Effect of Alendronate Administration on Bone Mineral Density and Bone Strength in Castrated Rats. **Horm Metab Res.** 2005 Jul;37(7):414-8.

Canettieri ACV, Colombo CED, Chins CM, Leite HF. Femur bone repair in ovariectomized rats under the local action of alendronate, hydroxyapatite and the association of alendronate and hydroxyapatite. **J Exp Path.** 2009;90:520-26.

Carvalho PSP, Bassi APF, Pereira LAVD. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. **Implant News** 2004;1(3):255-60.

Carvalho PSP, Ponzoni D. **Biologia da osseointegração.** In: Gomes LA. Implantes osseointegrados. São Paulo: Livraria Santos Editora; 2002; p.1-9.

Consolaro A.; Consolaro M. Os bifosfonatos e o tratamento ortodôntico: análise criteriosa e conhecimentos prévios são necessários. **Rev Dent Press Ortodon Ortop Facial.** 2008;13(4):19-25.

Cottrell JA, Vales FM, Schachter D, Worth SW, Gundlapalli R, Kapadia R, O'Connor JP. Osteogenic Activity of Locally Applied Small Molecule Drugs in a Rat Femur Defect Model. **Biotechnol.** 2010;2010:597641. Epub 2010 Jun 16.

Coxon FP, Thompson K, Rogers MJ. Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates. **Curr Opin Pharmacol.** 2006 Jun;6(3):307-12.

Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: Mechanism of Action and Role in Clinical Practice. **Mayo Clin Proc.** 2008 Sep;83(9):1032-45.

Ebetino FH, Bayless AV, Amburgey J, Ibbotson KJ, Dansereau S, Ebrahimpour A. Elucidation of a Pharmacophore for the Bisphosphonate Mechanism of Bone Antiresorptive Activity. **Phosph Sulfur Silic Relat Elem.** 1996;109(1/4):217-20.

Esposito M, Grusovin MG, Coulthard P, Worthington HV. The efficacy of various bone augmentation procedures for dental implants: a Cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2006 Sep-Oct;21(5):696-710.

Fernandes RG, Faig-Leite H, Carvalho YR. Study of bone repair in the mandible of rabbits under the action of sodium alendronate and its association with hydroxyapatite. **Rev Odontol UNESP.** 2004;33(3):123-30.

Fernandes RG. **Estudo da ação local do alendronato sódico, da hidroxiapatita e da associação do alendronato sódico com a hidroxiapatita, no reparo ósseo de fêmures de ratos.** [Tese] São José dos Campos (SP); Faculdade de Odontologia de São José dos Campos da Universidade Estadual Paulista, 2005.

Figueiredo AS. **Estudo morfológico comparativo entre implantes de osso bovino desvitalizado, hidroxiapatita de coral, poliuretana de mamona e enxerto ósseo bovino autógeno, em coelhos.** [Dissertação] São Paulo (SP); Universidade Federal de São Paulo, 2000.

Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. **Endocr Rev.** 1998 Feb;19(1):80-100.

Fogelman I, Pearson DW, Bessent RG, Tofe AJ, Francis MD. A comparison of skeletal uptake of three diphosphonates by whole body retention. **J Nucl Med.** 1981;22:880-83.

Frinkleman RD. Local delivery of chemotherapeutic agents in periodontal therapy: Has its time arrived? **J Clin Periodontol.** 1998;25:943-6.

Fromigue O, Body JJ. Bisphosphonates Influence the proliferation and maturation of normal human osteoblasts. **J Endocrinol Invest.** 2002; 25:539-46.

Ganguli A, Henderson C, Grant MH, Meikle ST, Lloyd AW, Goldie I. The interactions of bisphosphonates in solution and as coatings on hydroxyapatite with osteoblasts. **J Mater Sci Mater Med.** 2002 Oct;13(10):923-31.

García-Moreno C, Serrano S, Nacher M, Farré M, Díez A, Mariñoso ML et al. Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts. **Bone** 1998; 22:233-9.

Gill A, Gupta J, Sikri P. Evaluation of the relative efficacy of an alloplast used alone and in conjunction with an osteoclast inhibitor in the treatment of human periodontal infrabony defects: A clinical and radiological study. **Indian J Dent Res.** 2011 Mar-Apr;22(2):225-31.

Giuliani N, Pedrazzoni M, Negri G, Passeri G, Impicciatore M, Girasole G. Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures in vitro and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo. **Bone**. 1998;22(5):455-461.

Gomes GH. **Avaliação in vitro da citotoxicidade do alendronate de sódio sobre osteoblastos em cultura celular**. [Dissertação] São Paulo (SP) Faculdade de Odontologia da Universidade, 2006.

Gordjestani M, Dermaut L, De Ridder L, De Waele P, De Leersnijder W, Bosman F. Osteopontin and bone metabolism in healing cranial defects in rabbits. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg**. 2006 Dec;35(12):1127-32.

Grandi G. **Análise histomorfométrica comparativa entre o cimento de α -TCP e os grânulos de β -TCP/HÁ no reparo ósseo de calotas cranianas de ratos**. [Tese] Porto Alegre (RS); Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2007.

Graziani F, Rosini S, Silva C, La Ferla F, Gabriele M. The effects of systemic ALN with or without intra-alveolar collagen sponges on post extractive bone Resorption: a single masked randomized clinical trial. **J Craniofac Surg**. 2008 Jul;19(4):1061-6.

Guyton AC, Hall JE. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

Habibovic P, Yuan H, Van Der Valk CM, Meijer G, Van Blitterswijk CA, Groot K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. **Biomater**. 2005;26:3565–75.

Halasy-Nagy JM, Rodan GA, Reszka AA. Inhibition of bone resorption by alendronate and residronate does not require osteoclast apoptosis. **Bone**. 2001;29:553-9.

Hofstaetter JG, Wang J, Hofstaetter SG, Glimcher MJ. The effects of high-dose, long-term alendronate treatment on microarchitecture and bone mineral density of compact and trabecular bone in proximal femur of adult male rabbits. **Arch Orthop Trauma Surg**. 2010; 130:937-944.

Houshmand B, Rahimi H, Ghanavati F, Alisadr A, Eslami B. Boosting effect of bisphosphonates on osteoconductive materials:a histologic in vivo evaluation. **J Periodont Res**. 2007; 42; 119–123

Im GI, Qureshi SA, Kenney J. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. **Biomater**. 2004; 25:4105-4115.

Iwata K, Li J, Follet H, Roger JP, Burr DB. Bisphosphonates suppress periosteal osteoblast activity independently of resorption in rat femur and tibia- **Bone** 2006; 39:1053–1058.

Jaime APG, **Anbinder AL, Lima AP, Prado FA, Balducci I, Rocha RF**. Influência da administração local de alendronato sódico no reparo ósseo em calvária de ratas ovariectomizadas. **Cienc Odontol Bras**. 2005; 8(2):70-9.

Jakobsen T, Kold S, Bechtold JE, Elmengaard B, Søballe K. Effect of topical alendronate treatment on fixation of implants inserted with bone compaction, **Clin Orthop Relat Res**. 2006;444:229–34.

Jakobsen T, Kold S, Bechtold JE, Elmengaard B, Søballe K. Local Alendronate Increases Fixation of Implants Inserted with Bone Compaction: 12-Week Canine Study. **Inc J Orthop Res**. 2007; 25:432–41.

Jakobsen, T. Baas J, Kold S, Bechtold E, Elmengaard B, Søballe K. Local bisphosphonate treatment increases fixation of hydroxyapatite-coated implants inserted with bone compaction. **J Orthop Res**. 2009;27(2):189-94.

Junqueira LC, Carneiro J. **Tecido ósseo**. In: _____. Histologia básica. 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004;136-53.

Kanis JA, Gertz BJ, Singer F, Ortolani S. Rationale for the use of alendronate in osteoporosis. **Osteoporos Int**. 1995 Jan;5(1):1-13.

Kawata T, Tenjou K, Tokimasa C, Fujita, T et al. Effect of ALN on osteoclast differentiation and bone volume in transplanted bone. **Exp Anim**. 2004;53 (1):47-51.

Kieczkowski GR, Jobson RB, Melillo DG, Reinhold DF, Grenda VJ, Shinkai I. Preparation of (4-Amino-1-Hydroxybutylidene) bisphosphonic acid sodium salt, MK-217 (Alendronate Sodium). An improved procedure for the preparation of 1 Hydroxy-1,1-bisphosphonic acids. **J Organ Chem**. 1995;60(25):8310-12.

Killeen AC, Rakes PA, Schmid MJ, Zhang Y, Narayana N, Marx DB et al. Impact of Local and Systemic Alendronate on simvastatin-induced new bone around periodontal defects. **J Periodont**. 2012 Dec;83(12):1463-71

Komatsu K, Shimada A, Shibata T, Shimoda S, Oida S, Kawasaki K et al. Long-term effects of local pretreatment with alendronate on healing of replanted rat teeth . **J Periodont Res** 2008;43:194–200.

Lasseter KC, Porras AG, Denker A, Santhanagopal A, Daifotis A. Pharmacokinetic considerations in determining the terminal elimination half-lives of bisphosphonates. **Clin Drug Invest**. 2005; 25(2):107-14.

Lazarovici T, Yahalomy R, Taicher E, Elad S, Hardan J, Yarom N. Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws: A Single-Center Study of 101 Patients . **J Oral Maxillofac Surg**. 2009;67:850-855.

Lee JW, Jhee O, Yuan H, Kim T, Kim D, Lee M et al. Effect of Korean Oriental Medicine Extract on Bone Mass as Compared with Alendronate in Ovariectomized Rats. **J Med Food**. 2005;8(3):369-76.

Levin L, Bryson EC, Caplan D, Trope M. effect of topical alendronate on root resorption of dried replanted dog teeth. **Dent Traumatol**. 2001 Jun;17(3):120-6.

Licata AA. Bisphosphonate Therapy. **Am J Med Sci**. 1997 Jan;313(1):17-22.

Lin JH, Duggan DE, Chen IW, Ellsworth RL. Physiological disposition of alendronate, a potent antiosteolytic bisphosphonate, in laboratory animals. **Drug Metab Dispos.** 1991 Sep-Oct;19(5):926-32.

Lin JH. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. **Bone.** 1996 Feb;18(2):75-85.

Lustosa-Pereira A, Garcia RB, de Moraes IG, Bernardineli N, Bramante CM, Bortoluzzi EA. Evaluation of the topical effect of alendronate on the root surface of extracted and replanted teeth. Microscopic analysis on rat's teeth. **Dent Traumatol.** 2006 Feb;22(1):30-5.

Maahs MA. **Associação entre o uso de bifosfonatos e osteonecrose dos maxilares: estudo em ratos.** [Tese] Porto Alegre (RS) Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2008.

Machado ALS, Silva CMOM, Brandão AAH, Arisawa EALR, Rocha F. Evaluation of sodium alendronate activity on bone repair under hormones absence. **Cienc Odontol Bras.** 2006;9 (3):6-12.

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endoc Rev.** 2000; 21:115-37.

Mazess RB. On aging bone loss. **Clin Orthop Relat Res.** 1982 May;(165):239-52.

McCarthy M. FDA alendronate approval. **The Lancet.** 1995;346:1028.

Menezes AM, Rocha FA, Chaves HV, Carvalho CB, Ribeiro RA, Brito GA. Effect of sodium alendronate on alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol** 2005;76:1901-9.

Meraw SJ, Reeve CM, Wollan PC. Use of alendronate in peri-implant defect regeneration. **J Periodontol.** 1999 Feb;70(2):151-8.

Miller SC; Bowman BM; Jee WSS. Available animal models of osteopenia – small and large. **Bone.** 1995;17(4):117-23.

Moreira MS et al. Cytotoxicity analysis of alendronate on cultured endothelial cells and subcutaneous tissue. A pilot study. **Dent Traumatol.** 2005;21: 329–35.

Mulinari M, Vaaraniemi J, Vaaraniemi HK. Intracellular Membrane Trafficking in bone resorbing osteoclasts. **Microsc Res Tech.** 2003 Aug 15;61(6):496-503.

Naidu A, Dechow PC, Spears R, Wright JM, Kessler HP, Opperman LA. The Effects of Bisphosphonates on Osteoblasts in vitro. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2008;106:5-13.

Oliveira RC, Sicca CM, Silva TL. Avaliação histológica e bioquímica da resposta celular ao enxerto de osso cortical bovino previamente submetido a altas temperaturas. Efeito da temperatura no preparo de enxerto xenógeno. **Rev Bras Ortoped.** 2003;38(9):551-60.

Omi H, Kusumi T, Kijima H, Toh S. Locally administered low-dose alendronate increases bone mineral density during distraction osteogenesis in a rabbit model. **Bone Joint Surg Br.** 2007 Jul;89(7):984-8.

Parfitt K. **Bone Modulating Drugs.** In: _____. Martindale: The complete drug reference. 32 ed. London: Pharmaceutical Press. 1999; p.730 – 35.

Ponte-Fernandez N, Estefania-Fresco R, Aguirre-Urizar JM. Bisphosphonates and oral pathology I: general and preventive aspects. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.** 2006 Aug 1;11(5):E396-400.

Porras AG, Holland SD, Gertz BI. Pharmacokinetics of alendronate. **Clin Pharmacokinet.** 1999;36(5):315-28.

Pradeep AR, Kumari M, Rao NS, Naik SB. 1% Alendronate Gel as Local Drug Delivery in the Treatment of Degree II Furcation Defects: A Randomized Controlled Clinical Trial. **J Periodontol.** 2012 May 3. [Epub ahead of print].

Reddy GT, Kumar TMP, Veena KM. Formulation and Evaluation of Alendronate Sodium Gel for the Treatment of Bone Resorptive Lesions in Periodontitis. **Drug Deliv.** 2005;12:217–22.

Reinholz GG, Getz B, Pederson L, Sanders ES, Subramaniam M, Ingle JN et al. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. **Cancer Res.** 2000 Nov 1;60(21):6001-7.

Robbins SL, Cotran RS. **Patologia: bases patológicas das doenças.** 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

Rodan G , Reszka A, Golub E, Rizzoli R. Bone safety of long-term bisphosphonate treatment. *Curr Med Res Opin.* 2004 Aug;20(8):1291-300.

Rodan GA, Fleisch HA. Bisphosphonates: mechanism of action. **J Clin Invest.** 1996 Jun 15;97(12):2692-6

Rogers MJ, Gordon S, Benford HL et al. Cellular and molecular mechanisms of action bisphosphonates. **Cancer.** 2000 Jun 15;88(12 Suppl):2961-78.

Russel RG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. **Osteoporos Int.** 2008 jun;19(6):733-59

Russell RG, Rogers MJ. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. **Bone.** 1999 Jul;25(1):97-106.

Santos LA. **Desenvolvimento de Cimento de Fosfato de Cálcio Reforçado por Fibras para Uso na Área Médico-Odontológica.** [Dissertação] Campinas (SP) Universidade Estadual de Campinas, 2002.

Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD et al. Bisphosphonate action: alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. **J Clin Invest.** 1991 Dec;88(6):2095-105.

Schlegel KA, Fuchtnner G, Shultze-Mosgau S et al. Histologic Findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 2003 Jan-Feb;18(1):53-8.

Schmitz JP, Hollinger J. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin Orthop Relat Res**. 1986 Apr;(205):299-308.

Seal BL, Otero TC, Panitch A. A polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Mat Sci Engen R**. 2001;34(4/5):147-230.

Sharma A, Pradeep AR. Clinical efficacy of 1% alendronate gel in adjunct to mechanotherapy in the treatment of aggressive periodontitis: a randomized controlled clinical trial. **J Periodontol**. 2012a;83(1):19-26.

Sharma A, Pradeep AR. Clinical Efficacy of 1% Alendronate Gel as a Local Drug Delivery System in the Treatment of Chronic Periodontitis: A Randomized, Controlled Clinical Trial. **J Periodontol**. 2012b;83(1):11-18.

Sicca CM, Oliveira RC, Silva TL. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em ratos. Efeito do subcutâneo de tamanho da partícula. **Rev FOB**. 2000;8(1/2):1-10.

Silverman SL, Maricic M. Recent Developments in Bisphosphonate Therapy. **Semin Arthritis Rheum**. 2007;37:1-12.

Smith R. Investigation of osteoporosis. **Clin Endoc**. 1996;44(4):371-74.

Sparidans RW, Twiss IM, Talbot S. Bisphosphonates in bone diseases. **Pharm World Sci**. 1998;20(5):206-13.

Srisubut S, Teerakapong A, Vattraphodes T, Taweechaisupapong S. Effect of local delivery of alendronate on bone formation in bioactive glass grafting in rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2007;104:11-16.

Ten Cate AR. **Osso**. In: _____. Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001;7:101-22.

Tenenbaum HC, Shelemay A, Girard B, Zohar R, Fritz PC. Bisphosphonates and periodontics: potential applications for regulation of bone mass in the periodontium and other therapeutic/diagnosis uses. **J Periodontol**. 2002 Jul;73(7):813-22.

Toker H, Hakan O, Ozer H, Kaya E. Alendronate enhances osseous healing in a rat calvarial defect model. **Arch Oral Biol**. 2012 Nov;57(11):1545-50.

Väänänen K, Zhao H. **Osteoclast function**. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. Principles of Bone Biology. 2nd ed. San Diego: Academic Press. 2002;127-39.

Vasconcelos LW, Petrilli G, Paleckis LPG. **Enxertos Ósseos Autógenos na Implantologia**. In: Francischone CE et al. Osseointegração e o Tratamento Multidisciplinar. São Paulo: Quintessence. 2006; 9:201-28.

Vasikaran SD. Bisphosphonates: an overview with special reference to alendrona **Ann Clin Biochem.** 2001 Nov;38(Pt 6):608-23.

Veena HR, Prasad D. Evaluation of an aminobisphosphonate (alendronate) in the management of periodontal osseous defects. **J Indian Soc Periodontol.** 2010 Jan;14(1):40-5.

Von Knoch F, Jaquiere C, Kowalsky M, Schaeren S, Alabre C, Martin I, et al. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrowstromal cells. **Biomater.** 2005;26:6941-9.

Von Knoch F, Eckhardt C, Alabre C et al. Anabolic effects of bisphosphonates on peri-implant bone stock. **Biomater.** 2007;28:3549-59.

Wallace SS, Froum SJ, Cho SC, Elian N, Monteiro D, Kim BS, Tarnow DP. Sinus augmentation utilizing anorganic bovine bone (Bio-Oss) with absorbable and nonabsorbable membranes placed over the lateral window: histomorphometric and clinical analyses. **Int J Periodontics Restorative Dent.** 2005 Dec;25(6):551-9.

Woo SB, Hellstein JW, Kalmar JR. Narrative (corrected) review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. **Ann Intern Med.** 2006 May 16;144(10):753-61. Review. Erratum in: *Ann Intern Med.* 2006 Aug 1;145(3):235.

Xue Q, Li H, Xuenong, Z, Dalstra M, Lind M, Christensen FB, Bunger C. Alendronate treatment improves bone-pedicle screw interface fixation in posterior lateral spine fusion: An experimental study in a porcine model. **Int Orthop.** 2010;34:447-451.

Yaffe A, Binderman I, Breuer E, Pinto T, Golombo G. Disposition of alendronate following local delivery in a rat jaw. **J Periodontol.** 1999 Aug; 70 (8):893-5.

Yaffe A, Fine N, Alt I, Binderman I. The effect of bisfosfonates on alveolar bone resorption following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. **J Periodontol.** 1995;66(11):999-1003.

Yaffe A, Herman A, Bahar H, Binderman, I. Combined local application of tetracycline and bisphosphonates reduces alveolar bone reabsorption in rats. **J Periodontol.** 2003b Jul;74(7):1038-42.

Yaffe A, Iztzkovich M, Earon Y, Alt I, Lilov R, Binderman I. Local delivery of an aminobisphosphanate prevents the resorptive phase of alveolar bone following mucoperiosteal flap surgery in rats. **J Periodontol.** 1997;68(9):884-9.

Yaffe A, Kollerman R, Bahar H, Bindermen I. The influence of alendronate on bone formation and resorption in a rat ectopic bone development model. **J Periodontol.** 2003a Jan;74(1):44-50.

Young B, Heath JW. **Wheater histologia funcional: texto e atlas em cores.** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000;172-92.

Zambuzzi WF, Oliveira RC, Pereira FL, Cestari TM, Taga R, Granjeiro JM. Rat subcutaneous tissue response to microgranular porous anorganic bovine bone graft. **Braz Dent J.** 2006;17(4):274-8.

Zhu FB, Cai XZ, Yan SG, Zhu HX, Li R. The Effects of Local and Systemic Alendronate Delivery on Wear Debris-Induced Osteolysis In Vivo. **J Orthop Res.** 2010;28:893–99.



ANEXO A

**Aprovação do Projeto de Pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal
(CEPA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB)**

ANEXO B

Laudo farmacêutico da manipulação da solução de Alendronato de sódio nas concentrações de 0,5 e 1%, emitido por Ao Farmacêutico - Farmacêutica de Manipulação Ltda.

Página 01

Laudo farmacêutico da manipulação da solução de Alendronato de sódio nas concentrações de 0,5 e 1%, emitido por Ao Farmacêutico - Farmacêutica de Manipulação Ltda.

Página 02

ANEXO C

CONVERSÃO DO ALENDRONATO DE SÓDIO – DILUIÇÃO/CONCENTRAÇÃO

Maceió, 06 de janeiro de 2012.

Desenvolvimento par diluição/concentração.

Alendronato de sódio (ALN)

Peso Molecular: 325,12 gramas por litro= 1 Molar.

Peso molecular: 32,5121 mg/mL= 1 Molar.

OU

Molar	mg/mL	µg/mL ou ng/mL
1 M	32,512	Multiplicar por 1000
10^{-1} M	3,25	3,250 µg/mL
10^{-2} M	0,325	325 µg/mL
10^{-3} M	0,0325	32,512 µg/mL
10^{-4} M	0,00325	3,25 µg/mL
10^{-5} M	0,000325	325 ng/mL
10^{-6} M	0,0000325	32,5 ng/mL
10^{-7} M	0,00000325	3,25 ng/mL
10^{-8} M	0,000000325	325 pg/mL

µg= microgramas

ng= nanogramas

pg= picogramas

Prof. Dr. Petrúcio Públio de Pereira Barbosa

Prof. Adjunto Doutor em Ciências da Faculdade Estácio de Sá de Alagoas
Disciplina de Farmacologia