

RAQUEL GUEDES FERNANDES

**ESTUDO DA AÇÃO LOCAL DO ALENDRONATO SÓDICO, DA
HIDROXIAPATITA E DA ASSOCIAÇÃO ALENDRONATO SÓDICO
COM A HIDROXIAPATITA, NO REPARO ÓSSEO DE FÊMURES DE
RATOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal

RAQUEL GUEDES FERNANDES

**ESTUDO DA AÇÃO LOCAL DO ALENDRONATO SÓDICO, DA
HIDROXIAPATITA E DA ASSOCIAÇÃO ALENDRONATO SÓDICO
COM A HIDROXIAPATITA, NO REPARO ÓSSEO DE FÊMURES DE
RATOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em
Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal

Orientador: Prof. Adj. Horácio Faig Leite

São José dos Campos

2005

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

BELLINI, A.B.; SILVA, E.A. **Manual para elaboração de monografias: estrutura do trabalho científico.** São José dos Campos: FOSJC/UNESP, 2002. 82p.

FERNANDES, R.G. **Estudo da ação local do alendronato sódico, da hidroxiapatita e da associação alendronato sódico com a hidroxiapatita, no reparo ósseo de fêmures de ratos.** 2005. 127f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2005.

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Edson Parreiras Pires,
por todo seu amor e compreensão...
por perdoar os momentos ausentes e
sempre me incentivar.

Aos meus pais Darvem e Cleide,
meus maiores exemplos de vida...

A minha querida tia Dalva que
sempre esteve ao meu lado.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço neste momento, pelos dias que ainda virão,
ao meu Orientador

PROFESSOR ADJUNTO HORÁCIO FAIG LEITE

por ter me acolhido com carinho, paciência e
sabedoria.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, representada na pessoa do Diretor Prof. Adj. **Paulo Villela Santos Júnior**.

À Faculdade de Pindamonhangaba, representada na pessoa do Prof. Dr. **Luís Otávio Palhari**, pela oportunidade profissional.

À Profa. Dra. **Chung Man Chin** do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, pelo carinho e pela gentileza com que me recebeu, e por sua fundamental colaboração no estabelecimento da metodologia deste trabalho.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal** da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, representado pela Profa. Dra. **Rosilene Fernandes da Rocha**, pela oportunidade da realização do curso.

À Profa. Adj. **Yasmin Rodarte Carvalho**, pelos esclarecimentos prestados na descrição da análise histológica deste trabalho, disponibilizando gentilmente seu tempo e atenção.

Ao Prof. Dr. **Luiz Eduardo Blumer Rosa**, por sua amizade, ajuda e colaboração nos mais diversos momentos.

Ao funcionário **Paulo Rogério Martins**, da Disciplina de Anatomia, pela sua disposição e auxílio durante a fase experimental deste trabalho, bem como por sua amizade e compreensão.

À amiga **Maria Rosa Rozim Luz**, que tenho a grande alegria de conviver, por toda sua atenção, carinho, ajuda e paciência.

Aos funcionários do Biotério, **Lourival Jacob** e **Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos**, pela indispensável colaboração durante a fase experimental.

À Profa. Dra. **Simone Helena Gonçalves de Oliveira**, da Disciplina de Anatomia, por sua amizade e apoio.

À Bibliotecária **Angela de Brito Bellini**, pela cuidadosa correção desta tese, e às demais funcionárias da biblioteca, pelos esclarecimentos prestados.

Ao funcionário **Walter Cruz**, da Disciplina de Histologia, pela confecção das lâminas histológicas, além da agradável convivência.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação, **Rosemary** e **Erena** por toda atenção e orientação e às secretárias **Ivoneide** e **Sílvia** pela colaboração durante todo este curso.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação, pela alegria compartilhada em todos momentos.

Aos meus amigos e colegas de trabalho da Faculdade de Pindamonhangaba e do PAMO Mourisco da Prefeitura Municipal de Taubaté, por me ouvirem nos momentos difíceis e pelas palavras de incentivo.

Aos animais que foram sacrificados, pela indispensável contribuição na pesquisa.

**Aos alunos, que mesmo sem saber,
expressam o real sentido deste
trabalho.**

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	09
LISTA DE TABELAS.....	13
RESUMO.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Bisfosfonatos	19
2.2 Hidroxiapatita.....	37
2.3 Bisfosfonatos e hidroxiapatita.....	51
3 PROPOSIÇÃO.....	55
4 MATERIAL E MÉTODO.....	56
4.1 Animais.....	56
4.2 Divisão dos grupos.....	56
4.3 Cálculo dos materiais.....	59
4.4 Procedimentos cirúrgicos	60
4.5 Sacrifício.....	62
4.6 Análise dos resultados.....	64
4.6.1 Análise histológica.....	64

4.6.2 Análise histomorfométrica.....	64
4.7 Análise estatística.....	65
5 RESULTADOS.....	66
5.1 Análise histológica.....	66
5.1.1 Animais machos - sete dias.....	67
5.1.2 Animais fêmeas - sete dias.....	71
5.1.3 Animais machos - 21 dias.....	75
5.1.4 Animais fêmeas - 21 dias.....	79
5.2 Análise histomorfométrica.....	84
5.3 Análise estatística.....	93
6 DISCUSSÃO.....	100
7 CONCLUSÃO.....	111
8 REFERÊNCIAS.....	112
Anexo.....	126
...	
<i>ABSTRACT</i>	127

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Procedimentos cirúrgicos: a) incisão da pele; b) divulsão dos tecidos moles; c) exposição da superfície óssea do fêmur esquerdo; d) início da confecção do defeito ósseo; e) defeito ósseo; f) defeito ósseo preenchido por material..... 63
- FIGURA 2 - Animais machos, sete dias (vista panorâmica): **a) grupo controle:** anastomoses das trabéculas ósseas imaturas em direção do canal medular; **b) grupo amido:** trabéculas ósseas se projetando ao centro do canal medular; **c) grupo alendronato 1mol:** rede de fibrina no defeito e no canal medular e tecido muscular sobre a superfície do defeito (▲). Neoformação óssea extra-cortical (➔); **d) grupo alendronato 2moles:** rede de fibrina e neoformação óssea extra-cortical (➔); **e) grupo hidroxiapatita 1mol:** delicadas trabéculas ósseas; **f) grupo hidroxiapatita 2moles:** trabéculas ósseas neoformadas a partir do endóstio; **g) grupo alendronato mais hidroxiapatita:** rede de fibrina no defeito e neoformação óssea extra-cortical (➔). Aumento original 25x. HE..... 68
- FIGURA 3 - Animais machos, sete dias (centro do defeito): **a) grupo controle:** trabéculas ósseas delimitando espaços medulares; **b) grupo amido:** trabéculas ósseas e tecido conjuntivo celularizado; **c) grupo alendronato 1mol:** rede de fibrina; **d) grupo alendronato 2moles:** rede de fibrina; **e) grupo hidroxiapatita 1mol:** trabéculas ósseas imaturas delimitando espaço medulares; **f) grupo hidroxiapatita 2moles:** tecido conjuntivo celularizado; **g) grupo alendronato mais hidroxiapatita:** rede de fibrina e medula óssea. Aumento original 100x. HE..... 70

FIGURA 4 - Animais fêmeas, sete dias (vista panorâmica): **a) grupo controle:** trabéculas ósseas neoformadas e medula óssea no canal; **b) grupo amido:** trabéculas ósseas neoformadas a partir do endóstio e do perióstio; **c) grupo alendronato 1mol:** trabéculas ósseas neoformadas a partir do endóstio e neoformação óssea extra-cortical (➔); **d) grupo alendronato 2moles:** neoformação óssea extra-cortical (➔); **e) grupo hidroxiapatita 1mol:** trabéculas ósseas e medula óssea no interior do canal; **f) grupo hidroxiapatita 2moles:** trabéculas ósseas neoformadas e quantidade variável de medula no canal medular; **g) grupo alendronato mais hidroxiapatita:** trabéculas ósseas e neoformação óssea extra-cortical (➔). Aumento original 25x. HE.....

72

FIGURA 5 - Animais fêmeas, sete dias (centro do defeito): **a) grupo controle:** trabéculas ósseas delimitando espaços medulares; **b) grupo amido:** espaços medulares com tecido conjuntivo; **c) grupo alendronato 1mol:** delicadas trabéculas ósseas e tecido conjuntivo celularizado; **d) grupo alendronato 2moles:** grandes espaços medulares com tecido conjuntivo celularizado; **e) grupo hidroxiapatita 1mol:** tecido conjuntivo celularizado entre esparsas trabéculas ósseas; **f) grupo hidroxiapatita 2moles:** delicadas trabéculas ósseas e tecido conjuntivo rico em células; **g) grupo alendronato mais hidroxiapatita:** trabéculas ósseas imaturas e tecido conjuntivo celularizado. Aumento original 100x. HE.....

74

FIGURA 6 - Animais machos, 21 dias (vista panorâmica): **a) grupo controle:** defeito ósseo fechado em extensão; **b) grupo amido:** anastomose das trabéculas ósseas na superfície externa do defeito; **c) grupo alendronato 1mol:** trabéculas ósseas no defeito e preenchendo todo o canal medular (◆). Neoformação óssea extra-cortical (➔); **d) grupo alendronato 2moles:** evidente neoformação óssea extra-cortical (➔) e trabéculas ósseas no defeito e no interior do canal

medular ocupando parcialmente (◆); **e) grupo hidroxiapatita 1mol:** trabéculas ósseas neoformadas em direção ao centro do defeito; **f) grupo hidroxiapatita 2moles:** trabéculas ósseas anastomosadas no delimitando espaços medulares; **g) grupo alendronato mais hidroxiapatita:** trabéculas ósseas projetando-se para a região externa do defeito e neoformação extra-cortical (➔). Aumento original 25x. HE.....

76

FIGURA 7 - Animais machos, 21 dias (centro do defeito): **a) grupo controle:** trabéculas ósseas maduras; **b) grupo amido:** trabéculas ósseas e espaços medulares com tecido conjuntivo frouxo; **c) grupo alendronato 1mol:** trabéculas regularmente anastomosadas; **d) grupo alendronato 2moles:** trabéculas e espaços medulares com tecido conjuntivo frouxo; **e) grupo hidroxiapatita 1mol:** amplas trabéculas ósseas; **f) grupo hidroxiapatita 2moles:** anastomose das trabéculas ósseas na superfície externa; **g) grupo alendronato mais hidroxiapatita:** delicadas trabéculas e tecido conjuntivo celularizado. Aumento original 100x. HE.....

78

FIGURA 8 - Animais fêmeas, 21 dias (vista panorâmica): **a) grupo controle:** trabéculas ósseas fechando o defeito; **b) grupo amido:** anastomose das trabéculas ósseas unindo as margens do defeito; **c) grupo alendronato 1mol:** trabéculas e neoformação óssea extra-cortical (➔); **d) grupo alendronato 2moles:** trabéculas no defeito e no canal medular (◆). Neoformação óssea extra-cortical (➔); **e) grupo hidroxiapatita 1mol:** defeito ósseo preenchido por trabéculas; **f) grupo hidroxiapatita 2moles:** trabéculas anastomosadas fechando o defeito; **g) grupo alendronato mais hidroxiapatita:** trabéculas unindo as margens defeito e neoformação óssea extra-cortical (➔). Aumento original 25x. HE.....

80

FIGURA 9 - Animais fêmeas, 21 dias (centro do defeito): **a) grupo controle:** trabéculas ósseas maduras; **b) grupo amido:** anastomose das trabéculas ósseas; **c) grupo alendronato 1mol:** espaços medulares com tecido conjuntivo frouxo; **d) grupo alendronato 2moles:** trabéculas delimitando reduzidos espaços medulares; **e) grupo hidroxiapatita 1mol:** evidente anastomose das trabéculas ósseas maduras; **f) grupo hidroxiapatita 2moles:** anastomoses das trabéculas; **g) grupo alendronato mais hidroxiapatita:** espaços medulares com tecido conjuntivo e trabéculas ósseas. Aumento original 100x. HE..... 82

FIGURA 10 - Detalhes histológicos do defeito ósseo: a) imagem negativa do grânulo de hidroxiapatita envolvida por células gigantes multinucleadas (➔); b) trabécula óssea circundada por osteoblastos (➔) delimitando espaços medulares (❖); c) osteócito volumoso no interior da lacuna (➔) e osteoclasto presente no espaço medular (➔); d) linhas reversas (➔). Aumento original 100x, 100x, 400x e 400x, respectivamente. HE..... 83

FIGURA 11 - Gráfico ilustrativo das médias e DP dos dados da neoformação óssea nos diferentes grupos experimentais, aos sete e 21 dias, nos animais machos e fêmeas..... 96

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem do grupo controle no período de sete dias, macho e fêmea.....	84
TABELA 2 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem do grupo amido no período de sete dias, macho e fêmea.....	85
TABELA 3 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem do grupo alendronato - 1mol no período de sete dias, macho e fêmea.....	86
TABELA 4 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem do grupo alendronato - 2moles no período de sete dias, macho e fêmea.....	86
TABELA 5 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem do grupo hidroxiapatita - 1mol no período de sete dias, macho e fêmea.....	87
TABELA 6 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem do grupo hidroxiapatita - 2moles no período de sete dias, macho e fêmea.....	87

TABELA 7 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem do grupo alendronato + hidroxiapatita - 2moles no período de sete dias, macho e fêmea.....	88
TABELA 8 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem do grupo controle no período de 21 dias, macho e fêmea.....	89
TABELA 9 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem do grupo amido no período de 21 dias, macho e fêmea.....	89
TABELA 10 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem do grupo alendronato - 1mol no período de 21 dias, macho e fêmea.....	90
TABELA 11 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem do grupo alendronato - 2moles no período de 21 dias, macho e fêmea.....	90
TABELA 12 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem do grupo hidroxiapatita - 1mol no período de 21 dias, macho e fêmea.....	91
TABELA 13 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem do grupo hidroxiapatita - 2moles no período de 21 dias, macho e fêmea.....	91

TABELA 14 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem do grupo alendronato + hidroxiapatita - 2moles no período de 21 dias, macho e fêmea.....	92
TABELA 15 - Resultado referente aos valores médios da porcentagem da neoformação óssea, nos períodos de sete e 21 dias, em animais machos e fêmeas.....	92
TABELA 16 - Estatística descritiva referente aos grupos experimentais, no período de sete dias, em machos.....	93
TABELA 17 - Estatística descritiva referente aos grupos experimentais, no período de sete dias, em fêmeas.....	94
TABELA 18 - Estatística descritiva referente aos grupos experimentais, no período de 21 dias, em machos.....	94
TABELA 19 - Estatística descritiva referente aos grupos experimentais, no período de 21 dias, em fêmeas.....	95
TABELA 20 - Análise de variância a três fatores.....	97
TABELA 21 - Teste de Tukey para comparação entre os diferentes grupos experimentais e períodos de observação estudados.....	98

FERNANDES, R.G. **Estudo da ação local do alendronato sódico, da hidroxiapatita e da associação alendronato sódico com a hidroxiapatita, no reparo ósseo de fêmures de ratos.** 2005. 127f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2005.

RESUMO

Esta pesquisa avaliou o efeito do uso local do alendronato sódico, da hidroxiapatita e da associação alendronato mais hidroxiapatita em diferentes concentrações molares, no processo de reparação de defeitos ósseos em fêmures de ratos. Foi confeccionado no fêmur de 168 ratos (84 machos e 84 fêmeas) um defeito ósseo medindo 2,5mm de diâmetro. Estes animais foram divididos em grupos: controle, amido, alendronato um mol, alendronato dois moles, hidroxiapatita um mol, hidroxiapatita dois moles e alendronato mais hidroxiapatita, de acordo com o material de preenchimento utilizado. Nos animais do grupo controle o defeito ficou preenchido apenas pelo coágulo proveniente do defeito. Os animais foram sacrificados aos sete e 21 dias, quando o fêmur era removido, fixado e descalcificado, para a confecção de lâminas histológicas. Foi realizada análise histológica e histomorfométrica, e os dados obtidos foram submetidos à análise estatística ANOVA. Aos sete dias, observava-se trabéculas ósseas imaturas, contendo grandes osteócitos. Notava-se neoformação óssea em todos os grupos, exceto nos animais machos onde o alendronato se fazia presente. Nos grupos que receberam a hidroxiapatita, visualizava-se as imagens negativas dos grânulos da hidroxiapatita. Aos 21 dias, as trabéculas praticamente fechavam o defeito da maioria dos espécimes estudados. Estatisticamente, houve diferenças entre machos e fêmeas, entre os períodos de observação e com relação ao uso do alendronato. Concluiu-se que a aplicação local do alendronato sódico interferiu negativamente na reparação óssea, que a hidroxiapatita e o alendronato mais a hidroxiapatita não interferiram na reparação e que a reparação óssea foi maior nas fêmeas independentemente do período estudado.

PALAVRAS-CHAVE: Regeneração óssea; osso; reparação; bisfosfonatos; alendronato; hidroxiapatita; animal.

1 INTRODUÇÃO

Várias são as pesquisas que visam melhorar e acelerar o processo de reparação óssea. Inicialmente, com o intuito de substituir osso perdido, eram realizados enxertos de osso autógeno, provenientes da costela, tíbia, crista íliaca e também da região mentoniana. Apesar do sucesso destes enxertos, ocorriam outras complicações nas áreas doadoras como infecções, dores, nevralgias, prolongada recuperação etc. (RANSFORD et al.⁶⁴, 1998). Este fato gerou interesse por outras pesquisas visando desenvolver materiais que pudessem substituir o osso perdido, bem como drogas que de alguma maneira auxiliasse o processo da reparação óssea.

Os materiais para implantes ósseos podem apresentar três diferentes mecanismos de ação: a osteogênese, a osteoindução e a osteocondução. Materiais osteogênicos são os capazes de formar osso diretamente, a partir dos osteoblastos provenientes da área doadora. Os osteoindutores induzem a transformação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos e intensificam o crescimento ósseo, mesmo onde ele não é esperado. Por fim, há os materiais osteocondutores, que são aqueles que permitem aposição óssea a partir de osso preexistente e necessitam da presença de tecido ósseo (MISCH & DIETSH⁵⁸, 1993).

Dentre os vários materiais aloplásticos, a hidroxiapatita tem recebido grande atenção, devido à sua capacidade de integração ao leito receptor, à sua biocompatibilidade (RUANO et al.⁷¹, 1996; BARBARA et al.⁴, 1997; CARIA¹¹, 1999; FERNANDES²², 2002; XIE et al.⁸⁸, 2004) e por sua reconhecida propriedade de osteocondução (KENT et al.⁴⁴, 1982; CHANG et al.¹², 2000; ORLOVSKII et al.⁶¹, 2002).

Já em relação às drogas estudadas que apresentam a propriedade de auxiliar o processo da reparação óssea, se destaca um grupo de fármacos denominado bisfosfonatos. Estes fármacos apresentam uma molécula bastante estável, além de apresentarem alta afinidade pela hidroxiapatita do osso ficando retidos no tecido ósseo na forma inativa, por um longo período, sendo liberados localmente durante os processos de reabsorção óssea (BIKLE⁶, 1998; SPARIDANS et al.⁷⁸, 1998).

Trabalhos encontrados na literatura relatam que o alendronato sódico, sendo um aminobisfosfonato, liga-se fortemente aos cristais de hidroxiapatita do osso, especialmente nos pontos de ativo remodelamento ósseo (RANG et al.⁶³, 2001; SHERMAN⁷⁴, 2001) e também apresenta a capacidade de inibir a reabsorção óssea, cujo principal mecanismo de ação está relacionado à diminuição da atividade osteoclástica (KULAK & BILEZIKIAN⁴⁶, 2000; YAFFE et al.⁹² (2000); RANG et al.⁶³, 2001). Assim, o alendronato sódico apresenta como uma de suas propriedades químicas a redução da perda de tecido ósseo, fato este que ocorre em doenças caracterizadas pela elevada ação dos osteoclastos ou por um desequilíbrio na relação osteoblasto-osteoclasto, como por exemplo na osteoporose, na osteólise induzida por tumores, na hipercalcemia e na doença de Paget (BRUNSVOLD et al.¹⁰, 1992; WEINREB et al.⁸⁵, 1994; OWENS et al.⁶², 1997; YAFFE et al.⁹⁰, 1997; FOGELMAN et al.²⁷, 2000; TORREGROSSA et al.⁸², 2003).

Devido ao fato de existir na literatura inúmeros trabalhos que descrevem a ligação entre os bisfosfonatos e os cristais de hidroxiapatita, principalmente nos pontos de remodelamento ósseo ativo, acreditamos ser importante continuarmos a estudar a ação dos bisfosfonatos, em especial do alendronato sódico, associado concomitantemente ao uso da hidroxiapatita (FERNANDES et al.²³, 2004), buscando obter desta associação resultados positivos no processo de reparação de defeitos ósseos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A literatura será apresentada levando-se em consideração as variantes que serão objetos de estudo no presente trabalho. Desta forma, serão apresentados estudos e pesquisas sobre os bisfosfonatos de uma forma geral com um enfoque específico no alendronato sódico, bem como trabalhos realizados com a utilização da hidroxiapatita e com a união desses dois elementos.

2.1 Bisfosfonatos

Os primeiros bisfosfonatos foram sintetizados há mais de cem anos por Menschutkin, Von Baeyer e Hofmann. Por sua propriedade de inibir a precipitação de sais de cálcio, a primeira aplicação dos bisfosfonatos foi como agente anticorrosivo. Não foram descritos como agentes potencialmente terapêuticos até 1968. Entretanto, desde então, os bisfosfonatos têm sido pesquisados e desenvolvidos, de forma bem sucedida, para o tratamento de muitas doenças ósseas (KULAK & BILEZIKIAN⁴⁶, 2000).

Os bisfosfonatos, também chamados de difosfonatos são compostos sintéticos análogos ao pirofosfato presente no organismo. O pirofosfato é constituído por um átomo de oxigênio que está ligado a dois grupos de fosfato (P-O-P). Nos bisfosfonatos este átomo de oxigênio é substituído por um átomo de carbono (P-C-P), sendo que o átomo de carbono que liga os dois grupos de fosfato confere grande resistência à molécula de bisfosfonato (BIKLE⁶, 1998). Segundo Fleisch²⁶ (1997),

alterações nos radicais (cadeias laterais) e esterificação dos grupos fosfato resultaram no grande número de diferentes bisfosfonatos descritos até hoje, onde cada um deles apresenta características físico-químicas e biológicas próprias, mas todos eles possuem forte afinidade pelo fosfato de cálcio e, portanto pelo tecido ósseo.

Marcus⁵³ (1996) citou que o primeiro bisfosfonato de uso clínico foi o etidronato, mas que este era um potente inibidor da mineralização, a ponto de desenvolver osteomalácia nos pacientes tratados com este medicamento. Assim, foram criados outros bisfosfonatos para diminuir esta ação, compondo os chamados bisfosfonatos de segunda e terceira gerações. Os constituintes das duas últimas gerações, além de parecer não inibir a calcificação, podem ser administrados em esquemas cíclicos e de forma contínua produzindo um aumento significativo na densidade óssea (FLEISCH²⁵, 1991). Grynepas et al.³⁷ (1992) afirmaram que estudos em animais têm demonstrado uma melhora nas propriedades biomecânicas do osso.

Marcus⁵³ (1996) descreveu ainda que a utilidade clínica dos bisfosfonatos reside na sua capacidade de inibir a reabsorção óssea. O autor afirmou que possivelmente, o bisfosfonato se incorpore à matriz óssea e seja assimilado pelo osteoclasto durante o processo de reabsorção, inativando esta célula, diminuindo a reabsorção óssea. Os bisfosfonatos mais recentes chegam a possuir uma potência anti-reabsorção 10.000 vezes maior que os medicamentos da primeira geração (KULAK & BILEZIKIAN⁴⁶, 2000). Autores como Fleisch²⁶ (1997), Kulak & Bilezikian⁴⁶ (2000) e Warner⁸⁴ (2000) explicaram que a inibição da reabsorção óssea proporcionada pelos bisfosfonatos é mediada por uma ação direta sobre os osteoclastos e em parte pelos osteoblastos, que passam a produzir um inibidor do recrutamento de osteoclastos. A supressão do processo de reabsorção óssea dos osteoclastos causada pela ação destes compostos ainda é um mecanismo que não está bem esclarecido (YAFFE et al.⁸⁹, 1995; BIKLE⁶, 1998). Apesar deste

mecanismo de ação geral dos bisfosfonatos, cada um dos bisfosfonatos possui características biológicas e físico-químicas próprias, não sendo possível, na maioria das vezes, extrapolar os resultados obtidos de um composto para os demais (KULAK & BILEZIKIAN⁴⁶, 2000).

Sparidans et al.⁷⁸ (1998) descreveram que os bisfosfonatos apresentam alta afinidade pela hidroxiapatita ficando retidos no osso na forma inativa e são liberados localmente durante os processos de reabsorção óssea, agindo preferencialmente nos osteoclastos. Os mecanismos envolvidos podem ser a inibição do recrutamento dos osteoclastos, a diminuição da aderência dessas células na matriz mineralizada, e a diminuição na diferenciação e no tempo de vida celular. Conseqüentemente, ocorre uma diminuição do número de osteoclastos, possivelmente por indução da apoptose celular. A inibição da atividade osteoclástica pode ser por um efeito direto do medicamento sobre a célula, verificado pelas alterações morfológicas celulares, como modificações no citoesqueleto e na borda em escova. Essas alterações ocorrem, *in vitro*, somente quando osteoclastos estão ativamente reabsorvendo a matriz óssea. Além disso, os autores citaram a possibilidade da existência de um efeito indireto dos bisfosfonatos mediado pelos osteoblastos, que liberariam inibidores de atividade e do recrutamento osteoclástico.

A distribuição tecidual dos bisfosfonatos no tecido não calcificado em doses terapêuticas é mínima; por outro lado, ligam-se avidamente a hidroxiapatita do osso (COMPSTON¹⁴, 1994).

O alendronato é o bisfosfonato mais amplamente utilizado para o tratamento da osteoporose, elevando a densidade mineral óssea. Fleisch²⁶ (1997) relatou que a concentração do alendronato nos osteoclastos alcança valores bastante altos, induzindo mudanças reais na morfologia celular, que passa a apresentar maior número de núcleos e também alterações na borda em escova, que se mostra inativa. Baseado em estudos, o autor concluiu que a dose mais favorável para o tratamento

da osteoporose seria de 10mg/dia. Esta quantidade foi determinada após serem testadas diferentes doses do medicamento a fim de se estabelecer a dose ideal. Após um ano de acompanhamento, as mulheres medicadas com 10mg/dia foram as que apresentaram o maior aumento da densidade óssea e um grande decréscimo na incidência de novas fraturas.

Visando minimizar alguns efeitos colaterais decorrentes da ingestão diária do alendronato sódico, como úlceras esofágicas, constipações ou diarréias, Alekna & Tamulaitiene¹ (2001) descreveram o desenvolvimento do comprimido de alendronato sódico contendo 70mg que deve ser ingerido semanalmente. Além de reduzir os efeitos colaterais já citados, o comprimido semanal proporciona maior conforto ao paciente e diminui a possibilidade de esquecimento de ingestão do medicamento.

Os bisfosfonatos, de maneira geral, são fracamente biodisponíveis, Kulak & Bilezikian⁴⁶ (2000) descreveram que somente uma fração de uma dose oral alcança a circulação sistêmica. Após administração por via oral do alendronato, sua biodisponibilidade é de apenas 0,7%. Lin⁵⁰ (1996) citou que a absorção oral dos bisfosfonatos é dose-dependente. O autor, baseado em estudos utilizando ratos, demonstrou que após uma elevação da dose oral de alendronato de 2 mg/ kg para 40 mg/kg, havia um aumento da concentração da droga no osso do animal e também um aumento da biodisponibilidade de 0,5% para 5%. Observou ainda, que estes medicamentos são mais bem absorvidos no estado de jejum que no pós-prandial, concluindo que a presença do alimento diminui bastante a eficiência da absorção.

Lin et al.⁵¹ (1991) avaliaram a absorção e a deposição do alendronato em diferentes animais. Após administração intravenosa, o alendronato foi rapidamente removido do plasma sendo capturado pelo osso ou excretado pelos rins. Cerca de 30 a 40% da dose administrada foi excretada decorridas 24 horas. Nos tecidos não calcificados, houve pouco ou nenhum acúmulo da droga. Absorção do alendronato administrado por

via oral foi estimada em cerca de 0,9% para rato, 1,8% para cachorro e 1,7% para macacos. A meia vida do alendronato variou de duzentos dias em ratos e, aproximadamente, mil dias em cães. Os autores detectaram também que o alendronato é metabolicamente estável, pois não houve evidência de metabólitos da droga na urina dos animais.

Brunsvold et al.¹⁰ (1992) mensuraram os efeitos clínicos e radiográficos do alendronato na periodontite desenvolvida em 27 macacos, que foram divididos em três grupos nos quais foram administrados, solução salina (controle), e alendronato em duas diferentes concentrações (0,05 mg/Kg e 0,25 mg/Kg) na veia safena duas vezes por semana por um período de 16 semanas. Uma semana após o início do tratamento nos molares e premolares mandibulares foi colocada uma ligadura que foi inoculada com *Porphyromonas gingivalis* para a indução da doença periodontal. Pela análise radiográfica, o alendronato na concentração de 0,05 mg/Kg retardou a progressão da periodontite, já a concentração mais elevada do alendronato não diferiu estatisticamente do grupo controle. Os índices clínicos não foram afetados estatisticamente pelas concentrações estudadas.

Weinreb et al.⁸⁵ (1994) estudaram a eficácia do alendronato na redução óssea alveolar causada por periodontite experimental em macacos. A periodontite foi iniciada em macacos adultos por meio da colocação de ligaduras nos molares mandibulares até a junção esmalte-cimento e por subsequente inoculação de *Porphyromonas gingivalis*. Os dentes da outra hemi-arcada não receberam as ligaduras, sendo usados como controle. Os animais receberam, por via intravenosa, solução salina (placebo) ou alendronato a 0,05mg/Kg e 0,25mg/Kg, duas vezes por semana, durante 16 semanas. Os resultados mostraram que nos animais tratados com a solução salina, a ligadura e a inoculação provocaram uma significativa perda óssea desde a junção esmalte-cimento até a região da furca. Os animais que foram tratados com o alendronato a 0,05mg/Kg apresentaram uma

redução da perda óssea associada à periodontite. Já a dose de 0,25mg/Kg não foi efetiva na redução da perda óssea na região esmalte-cimento.

Liberman et al.⁴⁹ (1995) trataram 994 mulheres com osteoporose pós-menopausa, durante um período de três anos. Os pesquisadores dividiram as mulheres em dois grupos. No primeiro grupo, as mulheres ingeriram placebo ou foram tratadas com 5mg de alendronato sódico ou 10 mg de alendronato sódico diariamente, durante os três anos de estudo. No segundo grupo, as mulheres foram tratadas durante dois anos com alendronato sódico na dosagem de 20 mg e durante o terceiro ano com 5 mg de alendronato. Os autores verificaram que as mulheres tratadas com o alendronato apresentaram um aumento progressivo e significativo na densidade óssea em todo o esqueleto, enquanto as que receberam o placebo exibiram um decréscimo da densidade óssea. Deste modo, afirmaram que o tratamento diário com o alendronato aumentou progressivamente a massa óssea corpórea e reduziu a incidência de fraturas vertebrais, a progressão de deformidades e perda de altura nas mulheres tratadas.

Reddy et al.⁶⁵ (1995) utilizaram o alendronato em cães com doença periodontal, administrando dose de 3,0mg/kg, semanalmente, por via oral, por um período de seis meses. Clinicamente, notaram diminuição da mobilidade dentária e por meio de análise histomorfométrica, observaram um aumento significativo da densidade da massa óssea dos animais medicados, comparado ao grupo controle (não medicado).

Owens et al.⁶² (1997) estudaram a ação do alendronato durante o mecanismo de reabsorção óssea. Devido a sua localização nas superfícies ósseas, os autores compararam a sensibilidade dos componentes do processo de reabsorção. Observaram que a ativação dos osteoclastos a partir de células estromais e/ou osteoblastos é aparentemente o componente mais sensível do processo da reabsorção

óssea e que a habilidade do alendronato de suprimir a ativação osteoclástica não depende da liberação do alendronato das superfícies ósseas.

Yaffe et al.⁹⁰ (1997) demonstraram que cirurgias de retalhos mucoperiosteais realizadas em ratos desencadeiam uma reabsorção óssea alveolar similar às observadas clinicamente em humanos. Os autores também demonstraram em trabalhos anteriores, que um aminobisfosfonato que é usado na prevenção da reabsorção óssea na osteoporose e em outras doenças ósseas reduzem a reabsorção óssea alveolar em modelos de ratos quando administrado sistemicamente. Assim, eles avaliaram o efeito da aplicação local do aminobisfosfonato associado a retalhos mucoperiosteais realizados na região dos premolares e molares da mandíbula de ratos aplicando este medicamento sobre a superfície óssea exposta e posteriormente recobrando a região com o mesmo retalho. Os resultados mostraram que a distribuição local do aminobisfosfonato reduziu significativamente a reabsorção óssea alveolar ativada pelo retalho mucoperiosteal. Este estudo sugeriu que a aplicação local deste medicamento pode ser utilizada como uma terapia complementar na redução da perda óssea pós-cirúrgica.

Giuliani et al.³² (1998) afirmaram que estudos *in vitro* têm mostrado que os bisfosfonatos além de atuarem como potentes inibidores dos osteoclastos na reabsorção óssea, podem também apresentar alguma ação direta sobre os osteoblastos. Por este motivo, os autores estudaram os efeitos em curto prazo de dois bisfosfonatos na formação de precursores de osteoblastos em culturas de medula óssea de ratas jovens e senis. Os animais jovens foram tratados semanalmente com injeções subcutâneas de etidronato (0,3mg/Kg, 3mg/Kg e 30mg/Kg) ou alendronato (0,3µg/Kg, 3µg/Kg e 30µg/Kg). Os animais senis foram tratados com as doses mais baixas de ambas as drogas. Os autores descreveram que a escolha das concentrações dos bisfosfonatos foi

devido à melhora das propriedades morfológicas do osso de ratas ovariectomizadas que foram tratadas com estas mesmas concentrações.

Decorrido um mês de tratamento, os animais jovens e senis foram sacrificados e, de cada animal foram obtidas células da medula óssea. Posteriormente, estas células foram utilizadas para a etapa do estudo *in vitro*, no qual foram observadas as unidades formadoras de colônias. Depois de um mês de tratamento, o etidronato (0,3mg/Kg e 3mg/Kg) e o alendronato (0,3µg/Kg e 3µg/Kg) aumentaram significativamente o número de unidades formadoras de colônias na medula óssea dos animais jovens e senis ao passo que as doses mais elevadas de ambas as drogas não tiveram efeito nos animais. Os resultados, somados a observações anteriores dos efeitos da formação óssea na osteoporose, sugeriram que os bisfosfonatos podem possuir, *in vivo*, uma influência potencialmente relevante nas células da linhagem dos osteoblastos, distinta das suas ações inibitórias sobre os osteoclastos. Além disso, os autores conjecturaram que a presença destas drogas, em baixas concentrações no osso e na medula óssea, podem estimular o processo de osteoblastogênese.

Giuliani et al.³³ (1998) realizaram um estudo *in vitro*, a fim de investigar o potencial do etidronato e do alendronato sódico sobre os osteoblastos na formação óssea. Foram avaliados o número de unidades formadoras de colônias de fibroblastos e o número de nódulos mineralizados em culturas de osso de rato e de osso humano. Os resultados indicaram que nas culturas de medula óssea de ratos o etidronato e o alendronato estimularam a formação de unidades formadoras de colônia. Foi observado que os nódulos mineralizados foram inibidos pelos bisfosfonatos em altas concentrações ($>10^{-6}$ M) e foram estimulados em concentrações mais baixas (de 10^{-7} M a 10^{-9} M para o etidronato e de 10^{-7} M a 10^{-10} M para o alendronato). Nas culturas de medula óssea humana, os resultados foram similares. O alendronato estimulou as unidades formadoras de colônias com um efeito máximo

obtido a uma concentração de 10^{-10} M. Esta mesma concentração também foi a que apresentou um melhor efeito em relação à formação dos nódulos mineralizados. Assim, os autores concluíram que estes bisfosfonatos afetaram diretamente os osteoblastos proporcionando um efeito positivo na formação óssea, provavelmente pela estimulação de fatores de crescimento destas células.

Gandolfi et al.²⁹ (1999) realizaram um estudo *in vitro* utilizando culturas de osteoblastos, nas quais observaram os estágios iniciais do crescimento osteoblástico na presença de dois diferentes bisfosfonatos: o alendronato e o neridronato. A atividade osteoblástica foi geralmente observada nas células em contato com o alendronato e com o neridronato, exceto na concentração de 10^{-4} do neridronato onde foi observado bioquimicamente, um claro efeito tóxico nas células. Desta maneira, pela detecção de marcadores osteoblásticos associados à correta configuração ultra-estrutural da morfologia das organelas citoplasmáticas dos osteoblastos sustentaram a hipótese dos pesquisadores sobre a ação metabolicamente positiva das moléculas de alendronato e de neridronato nos osteoblastos.

Yaffe et al.⁹¹ (1999) investigaram a efetividade da absorção do alendronato pelo osso aplicando topicamente este medicamento em sítios cirúrgicos com o auxílio de uma esponja gelatinosa encharcada por esta substância. Os resultados mostraram que 10% do total de alendronato contido na esponja foi absorvido pelo osso localmente. Decorrentes disto, os pesquisadores afirmaram que a distribuição local do alendronato e sua afinidade pelo osso podem se tornar dados muito importantes no tratamento preventivo da reabsorção óssea durante procedimentos ortopédicos e dentários.

Binderman et al.⁷ (2000) explicaram que em alguns procedimentos cirúrgicos onde são realizados retalhos mucoperiosteais, a atividade osteoclástica é ativada, ocorrendo uma reabsorção óssea nestes locais. Baseados nesta informação realizaram cirurgias com

elevação de um retalho mucoperiosteal próximo aos molares da mandíbula de ratos. No primeiro grupo experimental, o alendronato foi aplicado topicamente em diferentes concentrações, sendo elas: 1mg/ml, 5mg/ml, 20mg/ml, ou 40mg/ml. O medicamento foi aplicado com uma esponja gelatinosa encharcada com esta substância sobre a superfície óssea exposta do lado direito, por no mínimo duas horas. No segundo grupo experimental, o alendronato foi aplicado nas doses de 50µg, 200µg e 400µg e distribuído topicamente na região submucosa da bochecha do lado esquerdo, dentro de um pequeno corte no qual a esponja gelatinosa encharcada com a droga era posicionada. Os resultados demonstraram que a aplicação tópica do alendronato nas concentrações de 200µg e 400µg foi significativamente efetiva na redução da perda óssea. Geralmente a porcentagem da perda óssea moderada aumentou com uma elevação da dose do alendronato, enquanto que a porcentagem de reabsorção severa diminuía com o aumento da dose de alendronato.

D'Aoust et al.¹⁵ (2000) estudaram a ação do etidronato em relação à promoção da diferenciação de osteoblastos em feridas ósseas na calvária de ratos. Os autores observaram que nos animais medicados, houve um melhor fechamento da ferida óssea quando comparado aos animais do grupo controle. Os pesquisadores relataram que houve uma osteo-estimulação demonstrada por um aumento da formação de matriz óssea e depois de cessado o tratamento com o bisfosfonato, houve um aumento na mineralização desta matriz óssea neoformada.

Kaynak et al.⁴¹ (2000) analisaram histologicamente a efetividade da aplicação local do alendronato na prevenção da reabsorção óssea alveolar associada a retalhos mucoperiosteais na mandíbula de ratos. Os parâmetros analisados histopatologicamente foram: a presença de infiltrado de células inflamatórias no tecido periodontal, o número e a morfologia dos osteoclastos do osso alveolar e do septo interdental, os componentes fibróticos (fibras colágenas), a existência de lacunas de reabsorção e a existência de osteoblastos ativos. Não houve diferenças

estatisticamente significativas entre o grupo tratado com o alendronato e o grupo controle no que diz respeito à presença do infiltrado de células inflamatórias, ao número de osteoclastos e à atividade dos osteoblastos. Já, em relação aos componentes fibróticos, à morfologia dos osteoclastos e à existência de lacunas de reabsorção óssea houve diferenças estatísticas. Os autores consideraram que a aplicação local do alendronato pode ser usada como uma terapia coadjuvante na redução da perda óssea desencadeada cirurgicamente, bem como em procedimentos cirúrgicos odontológicos, onde materiais de enxerto ou de implante forem necessários.

Manolagas⁵² (2000) relatou que os bisfosfonatos são potentes inibidores da reabsorção óssea e extremamente efetivos no tratamento de osteoporose e doenças relacionadas à perda de osso. O mecanismo principal destas drogas está relacionado à ocorrência da diminuição de células progenitoras de osteoclastos, da diminuição do recrutamento dos osteoclastos e da promoção de apoptose dos osteoclastos maduros reduzindo desta forma a velocidade da reabsorção e do remodelamento ósseo. Além disso, o tratamento a longo prazo com essas drogas tem demonstrado uma elevação no número e na atividade de osteoblastos aumentando a possibilidade de que os bisfosfonatos não só reduzam a reabsorção óssea, mas também possam ter um efeito positivo na formação de osso.

Reinholz et al.⁶⁶ (2000) estudaram a ação direta de vários bisfosfonatos na proliferação celular, expressão genética e formação óssea por meio de culturas de osteoblastos provenientes de fetos humanos. Em culturas tratadas com pamidronato, ocorreu um aumento da proteína celular total, da atividade de fosfatase alcalina, bem como a secreção de colágeno tipo I a partir dos osteoblastos. De acordo com estes fatos, a taxa de formação óssea também aumentou nesta cultura de osteoblastos. A fraca ação do etidronato e o potente zoledronato também foram comparados com a ação do pamidronato sobre a proliferação dos

osteoblastos humanos e sobre a taxa de formação óssea. O pamidronato e o zoledronato diminuíram a proliferação celular com igual potência, ao passo que o etidronato diminuiu esta proliferação somente em concentrações muito altas. Quanto à formação óssea, o pamidronato e o zoledronato aumentaram a formação óssea, porém nenhum aumento foi observado pela ação do etidronato. Os autores finalizaram seu trabalho afirmando que estes resultados sugerem fortemente que o tratamento com pamidronato ou zoledronato aumenta a diferenciação e a atividades formadoras de osso pelos osteoblastos.

Silva⁷⁵ (2000) avaliou a ação do alendronato sódico na reparação óssea de ratas ovariectomizadas. Foram utilizadas 36 ratas adultas, formando quatro grupos constituídos por nove ratas ovariectomizadas e em cada animal foi realizada uma lesão na tíbia. O grupo controle não recebeu medicamento, enquanto os outros três grupos foram tratados com doses de 0,25mg/kg, 0,5mg/kg e 0,75mg/kg na água de beber, diariamente. Foram sacrificadas três ratas de cada grupo nos períodos de três, sete e 14 dias. A análise histológica das tíbias revelou uma deposição óssea mais marcante nos grupos tratados com doses mais elevadas de alendronato. O grupo de 14 dias, com dose de 0,5mg/kg, apresentou a deposição de trabéculas mais maduras e organizadas, sugerindo um processo de remodelação já bem desenvolvido, mostrando assim ser a ação do alendronato sódico dose-dependente.

Yaffe et al.⁹² (2000) realizaram retalhos mucoperiosteais na face lingual e vestibular, próximo aos dentes molares em ambos os lados da mandíbula de ratos. Por meio de uma esponjosa gelatinosa, os bisfosfonatos foram aplicados a partir de uma solução de 20mg da substância diluída em 1 ml de solução salina. Neste trabalho, foi comparado o efeito do etidronato e do alendronato e de três outros bisfosfonatos: VS-5, VS-6 e ISA-13 na diminuição da reabsorção óssea. Os resultados indicaram que VS-5, VS-6 e ISA-13 reduziram a reabsorção

óssea de forma mais eficaz que o etidronato e menos eficaz que o alendronato. Os autores concluíram que o alendronato aplicado topicamente foi o bisfosfonato mais efetivo para a redução da perda óssea.

Fayad²¹ (2001) avaliou as ações de duas formulações de bisfosfonatos no processo de reparação óssea em mandíbulas de ratos. Foi confeccionado um defeito ósseo na mandíbula de 92 ratos e estes foram divididos em cinco grupos, sendo: um controle; um medicado com alendronato durante dez dias, iniciando o tratamento no dia da cirurgia; um medicado com clodronato durante dez dias, iniciando o tratamento no dia da cirurgia; um medicado com alendronato durante dez dias, iniciando o tratamento cinco dias antes da cirurgia e um medicado com clodronato durante dez dias, iniciando o tratamento cinco dias antes da cirurgia; todos na dose de 1mg/kg/dia. Baseado nos resultados obtidos foi concluído que o alendronato e o clodronato não estimularam a reparação óssea neste modelo experimental e que a administração prévia à confecção do defeito não apresentou ação benéfica no processo de reparo.

Ringe et al.⁶⁷ (2001) trataram homens que apresentavam osteoporose, utilizando o alendronato sódico, na posologia de 10mg/dia, por via oral e, acompanharam estes pacientes por um período de dois anos. Decorrido este período de tratamento com o alendronato sódico, os autores verificaram um aumento de 10,1% na densidade mineral óssea nas vértebras lombares, uma redução no índice de novas fraturas vertebrais por volta de 7,4% e por fim, constataram que a terapia, além de proporcionar efeitos que favoreceram melhoria na densidade mineral óssea, foi também bem tolerada e promoveu uma estabilização da osteoporose em todos os pacientes.

Sherman⁷⁴ (2001) descreveu que a terapia com bisfosfonatos incluem drogas como o alendronato e o residronato, sendo que ambas vêm sendo aprovadas na prevenção e no tratamento da osteoporose pós-menopausa. O principal mecanismo de ação para o potente efeito de inibir a reabsorção óssea está vinculado à ligação dos bisfosfonatos aos cristais de hidroxiapatita do osso e subsequente inibição da produção e/ou atividade de osteoclastos. Foi demonstrado no *Fracture Intervention Trial*, que o alendronato promoveu benefícios substanciais ao esqueleto em mulheres pós-menopausa em duas categorias: naquelas com pouca massa óssea e naquelas com pouca massa óssea e com fraturas vertebrais. Em 2027 mulheres, com idade variando dos 55 aos 81 anos, com pouca densidade de massa óssea e com pelo menos uma fratura vertebral, 36 meses do uso do alendronato aumentou significativamente a densidade óssea, comparando com o uso de placebo, com valores em cerca de 6,2% na vértebra lombar, 4,7% no quadril e 4,1% no fêmur. O tratamento com alendronato resultou numa diminuição de 47% no risco de fraturas vertebrais em pacientes acompanhadas radiograficamente. As fraturas no quadril e no punho, também foram significativamente reduzidas em 50%, aproximadamente. Estes efeitos foram observados com uma dose de alendronato de 5mg/dia e aumentada para 10mg/dia, no terceiro ano experimental.

Jianhua et al.⁴⁰ (2002) avaliaram o efeito do alendronato nas propriedades estruturais dos ossos trabeculares de cães. O grupo tratado diariamente com uma dose de 0,5mg/Kg por um período de 12 semanas demonstrou um aumento no volume ósseo nas vértebras lombares L1 e L2 em 9,5% e 7,7%, respectivamente. Os autores concluíram que o alendronato induziu uma maior densidade mineral da superfície óssea.

Michigami et al.⁵⁷ (2002) realizaram um estudo para verificarem a ação do alendronato sódico em relação aos osteoblastos. Os autores relataram que o mecanismo de ação desta droga não está bem estabelecido, mas que certamente, as moléculas de alendronato são incorporadas ao tecido ósseo e atingem os osteoclastos, inativando estas células e também desencadeando a apoptose das mesmas. Desta forma, ocorre uma redução na reabsorção óssea. O objetivo do trabalho foi verificar como este fármaco agia sobre os osteoblastos. Os resultados apontaram que o alendronato sódico apresentou um mecanismo de ação que ativa os osteoblastos, ou seja, ocorre um aumento no metabolismo celular dos osteoblastos e desta maneira, os autores concluíram que esta droga promove a neoformação óssea.

Solomon⁷⁷ (2002) afirmou que diversos bisfosfonatos, como por exemplo o alendronato, exercem uma ação direta nos osteoclastos para inibir a reabsorção óssea. Além disso, podem apresentar uma ação nos osteoblastos, porém o mecanismo específico pelo qual estas drogas agem e previnem as fraturas ósseas em mulheres com osteoporose ainda foi esclarecido.

Tenenbaum et al.⁸⁰ (2002) escreveram um artigo revisando a literatura científica resgatando as aplicações potenciais dos bisfosfonatos na terapêutica da doença periodontal. Os autores descreveram que foi demonstrada a direta formação de matriz óssea durante o tratamento com etidronato em uma dosagem de 15mg/Kg, bem como houve posterior mineralização desta matriz óssea neoformada após a interrupção do tratamento com o alendronato. Devido a este fato especulou-se que os bisfosfonatos e o etidronato, em particular, poderiam não só ser úteis na prevenção da perda óssea mediada por osteoclastos, mas também, em condições apropriadas, estimularem a formação óssea. Os pesquisadores reforçam esta informação dizendo que de fato, em estudos realizados por eles anteriormente, o etidronato pôde ser utilizado

para estimular a formação de matriz óssea no interior de sistemas de implantes endósseos recobertos por titânio.

Biswas et al.⁸ (2003) avaliaram, por questionários enviados a médicos ingleses, os principais efeitos colaterais e as razões para a interrupção no tratamento com alendronato sódico, em 11.916 pacientes com osteoporose pós-menopausa. As condições mais encontradas foram náuseas e vômitos, dor abdominal, dispepsia, esofagite e refluxo esofágico. Reações adversas mais severas, possivelmente relacionadas ao alendronato, foram os relatos únicos de angioedema, eritema multiforme, hipercalcemia e hipocalcemia. Baseados neste questionários, os autores concluíram que o alendronato é bem tolerado na maioria dos pacientes. Entretanto, os efeitos gastrintestinais, como esofagite e úlcera esofágica, são freqüentes.

Gonnelli et al.³⁴ (2003) avaliaram o efeito do alendronato por três anos no tratamento da osteoporose em homens. O tratamento com alendronato aumentou significativamente a densidade mineral óssea na coluna lombar em 4,2% após um ano, 6,3% após dois anos e 8,8% após três anos. Em conclusão, o estudo confirmou que o alendronato representa um avanço terapêutico importante no controle da osteoporose masculina e a análise da densidade mineral óssea da coluna lombar pareceu ser o melhor método para monitorar o efeito do medicamento na massa óssea em osteoporose masculina.

Greenspan et al.³⁶ (2003) compararam tratamentos da osteoporose pós-menopausa baseados na reposição hormonal ou no uso de alendronato (10mg diário) e na combinação de ambos agentes. Os autores concluíram que todas as terapias foram bem toleradas por três anos e, após esse tempo de estudo, houve um maior aumento na densidade mineral óssea, em vértebras e fêmures, na terapia combinada que nas monoterapias. O aumento médio da massa óssea do quadril de mulheres tratadas apenas com alendronato foi significativamente maior que aquele obtido no grupo com reposição hormonal.

Kaynak et al.⁴² (2003) estudaram o efeito da administração sistêmica do alendronato a 0,5mg/Kg na prevenção da reabsorção óssea alveolar desencadeado por cirurgias de retalho mucoperiosteal. Foram aplicadas injeções subcutâneas uma semana antes da cirurgia, imediatamente antes da cirurgia e uma semana após a cirurgia. Os parâmetros determinados foram o infiltrado de células inflamatórias adjacente ao tecido periodontal, formação de fibrose e de fibras colágenas, número e morfologia dos osteoclastos do osso alveolar e do septo interdental, lacunas de reabsorção e atividade osteoblástica. Baseados nos resultados obtidos, os autores concluíram que a administração sistêmica de 0,5 mg/Kg de alendronato foi efetiva na prevenção da perda óssea alveolar e na modulação dos fatores inflamatórios teciduais.

Masud & Giannini⁵⁴ (2003) descreveram que o resultado clínico mais importante no tratamento da osteoporose é a redução de fraturas. As terapias atuais com bisfosfonatos foram as mais estudadas, principalmente, em relação aos etidronato, alendronato e residronato. Os autores citaram que o alendronato e o residronato apresentaram as mais fortes evidências de redução nas fraturas vertebrais e não-vertebrais.

Sambrook⁷² (2003) demonstrou que o uso do alendronato a longo prazo é um tratamento efetivo contra a osteoporose e quando utilizado diariamente, geralmente, é bem tolerado, mas que em alguns pacientes ocorreram sintomas gastrintestinais. O autor sugeriu que a dose semanal é segura e parece ser tão eficaz quanto a administração diária, promovendo uma melhor comodidade ao paciente.

Sambrook et al.⁷³ (2003) estudaram o efeito do alendronato, do calcitriol e da vitamina D na prevenção e tratamento da perda óssea induzida por glicocorticóides. 195 indivíduos foram divididos em três grupos tratados, sendo estes com calcitriol, ou vitamina D mais carbonato de cálcio, ou alendronato (10mg/dia) mais carbonato de cálcio. Após dois anos, a média das alterações na densidade mineral dos ossos

lombares foi de 5,9% com alendronato, 0,5% com vitamina D e 0,7% com calcitriol. Seis de 66 pacientes tratados com calcitriol, um dos 61 tratados com vitamina D e nenhum dos 64 pacientes medicados com alendronato apresentaram novas fraturas vertebrais. Os autores concluíram que o tratamento com alendronato é o mais indicado para prevenir as perdas ósseas induzidas por glicocorticóides.

Torregrosa et al.⁸² (2003) estudaram o efeito do alendronato em pacientes transplantados renais com osteoporose induzida pelo uso de corticosteróides. Doze meses após o transplante, 14 pacientes foram medicados com alendronato sódico 10mg/dia acrescido com vitamina D e cálcio e 12 pacientes controles foram tratados com vitamina D e cálcio apenas. Após um ano de estudo, os pacientes tratados com alendronato exibiram uma maior densidade mineral óssea. As vértebras lombares do grupo medicado com o bisfosfonato apresentaram aumento na densidade mineral de 4,3-6,1% contra 0,55-5,30% do grupo controle.

Duarte et al.¹⁹ (2004) avaliaram o impacto da terapia com alendronato e da reposição hormonal (com 17β estradiol) sobre a periodontite experimental em ratas ovariectomizadas. A ovariectomia gerou um impacto direto sobre o osso alveolar, sem considerar o acúmulo de placa e, aumentou, significativamente, a perda óssea da periodontite induzida. A administração do alendronato, mas não a reposição hormonal, reduziu significativamente o efeito da ovariectomia na perda óssea relacionada com a periodontite.

Rocha et al.⁶⁸ (2004) investigaram o efeito do tratamento com alendronato oral sobre as medidas radiológicas e clínicas da doença periodontal estabelecida em quarenta mulheres na pós-menopausa. O grupo controle e o grupo tratado com alendronato receberam tratamento periodontal no início do tratamento. A doença periodontal melhorou em ambos grupos, mas houve melhores resultados, em relação à profundidade de sondagem de bolsa periodontal e densidade mineral

óssea do osso esponjoso, no grupo que recebeu alendronato (10mg/dia). Os autores sugeriram que o tratamento com alendronato melhorou o quadro clínico da doença periodontal, podendo ser útil no tratamento periodontal de mulheres na pós-menopausa.

2.2 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita é o principal componente mineral do tecido ósseo, constituindo cerca de 75% do seu peso. No osso maduro, a hidroxiapatita aparece em forma de cristais com 15Å a 30Å de espessura e 100Å de comprimento. Estes cristais contêm cálcio, fósforo e íons hidroxila. A distribuição dos cristais de hidroxiapatita no tecido ósseo ocorre de forma regular, em intervalos de 600Å a 700Å ao longo dos prolongamentos das fibras colágenas e também da interação com outras proteínas não-colagenosas, o que proporciona a solidez e rigidez do osso (WEISS & GREEP⁸⁶, 1981).

Vários estudos experimentais foram realizados antes da aplicação clínica da hidroxiapatita, mas devido as suas propriedades, a hidroxiapatita vem sendo usada como um substituto do enxerto ósseo autógeno em várias situações. Denissen & De Groot¹⁶ (1979) a utilizaram como aumento e manutenção do rebordo alveolar. Kenney et al.⁴³ (1985) e Naaman Bou-Abboud et al.⁵⁹ (1994) fizeram aplicação em defeitos periodontais; Frame²⁸ (1987) em cirurgias buco-maxilo-faciais; Wolford et al.⁸⁷ (1987) em cirurgias ortognáticas e, atualmente, uma das suas maiores aplicabilidades está sendo na área da implantodontia, associada principalmente aos implantes de titânio.

A hidroxiapatita de cálcio é também denominada apatite ou hidróxido de fósforo pentacálcico, cuja fórmula química é $\text{Ca}_{10}(\text{PO})_4(\text{OH})_2$. Ela apresenta grande biocompatibilidade, tanto em

tecidos duros como em tecidos moles e sua principal função é a osteocondução, pois o fosfato de cálcio proporciona uma matriz para que se deposite osso novo entre as partículas do implante e o osso subjacente (KENT et al.⁴⁴, 1982; CARIA¹¹, 1999). Análises químicas mostraram que as apatitas biológicas presentes no esmalte, na dentina e no osso não são hidroxiapatitas puras, pois contêm outros íons incluindo CO₃, HPO₄, F, Cl, Mg, Na, K e algum traço de Zn e Sr, o que determinaria uma fórmula aproximada de (CaX)₁₀(PO₄HPO₄CO₃)₆(OH Y)₂, onde X são cátions (Mg, Na, Sr) que podem substituir os íons cálcio e Y são ânions (Cl e F) que podem substituir o grupo hidroxila (LEGEROS⁴⁷, 2002).

Os biomateriais a base de fosfato de cálcio diferem quanto à origem (natural ou sintéticos), quanto à composição (hidroxiapatita, beta-tricálcio fosfato e fosfato de cálcio bifásico), em relação à forma física de apresentação (partículas, blocos, cimentos, coberturas de implantes metálicos, compósitos com polímeros) e também segundo propriedades físico-químicas. Esses biomateriais têm outras propriedades importantes como a similaridade com o mineral ósseo, a bioatividade, que representa a habilidade de formar material semelhante à apatita óssea na sua superfície, capacidade de promover funções celulares que conduzem a formação de uma única e forte interface osso-biomaterial, e a osteocondução, ou seja, habilidade de fornecer um apropriado suporte ou molde para a formação óssea (LEGEROS⁴⁷, 2002).

Bell & Beirne⁵ (1988) avaliaram os efeitos da hidroxiapatita e do trifosfato de cálcio usados isoladamente ou misturados ao colágeno, no reparo de defeitos ósseos criados cirurgicamente, na mandíbula de trinta ratos. Decorridas quatro e 12 semanas após os implantes, os animais foram sacrificados e confeccionaram-se lâminas com cortes histológicos da área do defeito ósseo, contendo os materiais implantados, sendo os cortes histológicos observados por microscopia de luz. Observou-se osso em contato direto com os materiais implantados, que estavam na periferia do defeito, porém na porção central destes, os

implantes estavam circundados por tecido conjuntivo fibroso, contendo macrófagos e algumas células gigantes multinucleadas. Tão pouco a hidroxiapatita ou o trifosfato de cálcio induziram a reparação do defeito ósseo e mais, o uso do colágeno também não interferiu positiva ou negativamente no processo de reparação do defeito ósseo.

Eldeeb & Roszkowski²⁰ (1988) avaliaram o uso de uma hidroxiapatita em grânulos e em blocos como material de enxerto para resolução de deformidades ósseas cranianas em macacos. O experimento foi realizado em 12 animais, que foram sacrificados aos três, seis e 12 meses, após a cirurgia de implante. Uma avaliação clínica revelou que a hidroxiapatita em grânulos começou a se estabilizar dentro de três a quatro semanas, mas houve perda de altura, devido à acomodação do material com o tecido subpericranial. A hidroxiapatita em blocos manteve a altura do contorno craniano, mas 25% dos enxertos exibiram mobilidade. Uma avaliação histológica revelou que não houve evidência de inflamação ou reabsorção óssea em ambas as formas da hidroxiapatita. Os grânulos de hidroxiapatita ficaram separados entre eles e entre a interface óssea por uma camada de fibras colágenas, sendo que a hidroxiapatita em bloco foi também circundada por uma cápsula fibrosa. Não houve sinais de adesão entre os grânulos de hidroxiapatita. A interface osso-hidroxiapatita estava separada por uma camada fibrosa presente nos espécimes com a hidroxiapatita em grânulos, com exceção de um espécime no grupo de um ano de avaliação, que mostrou evidente formação óssea em parte desta interface. Os autores concluíram que o uso da hidroxiapatita em grânulos como material de enxerto para correção de deformidades ósseas cranianas em macacos é mais estável que a hidroxiapatita em bloco. Entretanto, a hidroxiapatita em bloco manteve um melhor contorno na forma estrutural.

Alper et al.² (1989) estudaram histologicamente, bioquimicamente e radiograficamente o efeito da implantação de hidroxiapatita de uma matriz óssea desmineralizada e da combinação

destes materiais, em defeitos ósseos realizados em ratos para verificar a indução da formação óssea, baseados no fato de que estes materiais vêm sendo estudados como agentes osteogênicos. Histologicamente, foi demonstrado um decréscimo na neoformação óssea ocorrida com a utilização da hidroxiapatita, comparada à neoformação óssea ocorrida no grupo controle. Os cristais de hidroxiapatita foram encapsulados por tecido conjuntivo fibroso. Pela análise bioquímica foi demonstrado um decréscimo de 16% na formação óssea nos ratos que receberam implante de matriz óssea desmineralizada, um decréscimo de 80% no grupo que recebeu a hidroxiapatita e um decréscimo de 80% no grupo que recebeu o implante de ambos os materiais associados. A análise radiográfica correspondeu positivamente aos resultados histológicos e bioquímicos. Os autores concluíram que a osteogênese em defeitos ósseos foi aumentada com a implantação da matriz óssea desmineralizada, enquanto que a hidroxiapatita interferiu negativamente na formação de novo osso em ratos. Na presença de ambas as substâncias, a hidroxiapatita pareceu impedir o aumento da neoformação óssea, prejudicando qualquer efeito positivo observado com a matriz óssea desmineralizada.

Cobb et al.¹³ (1990) realizaram um trabalho experimental visando avaliar por microscopia óptica, microscopia de transmissão e microscopia de varredura, a regeneração óssea de defeitos ósseos mandibulares realizados em macacos que, posteriormente, receberam enxertos constituídos de uma mistura de hidroxiapatita e osso autógeno. Utilizaram-se 15 animais, sendo que nestes foram realizados defeitos ósseos no corpo da mandíbula no lado esquerdo e no lado direito. Em todos os animais, o defeito ósseo do lado direito foi restaurado 100% com osso autógeno, retirado da crista ilíaca. O defeito do lado esquerdo foi restaurado da seguinte forma: três animais permaneceram com o defeito vazio; três animais receberam implante na proporção de 25% de hidroxiapatita e de 75% de osso autógeno; três animais receberam

implante na proporção de 50% de hidroxiapatita e osso autógeno; três animais receberam implante na proporção de 75% de hidroxiapatita e de 25% de osso autógeno e três animais receberam implante constituído de 100% de hidroxiapatita. Neste estudo, as descrições das observações microscópicas dos defeitos controles e dos defeitos que receberam implantes foram realizados decorridos seis e 18 meses das cirurgias.

Os resultados confirmaram a biocompatibilidade da hidroxiapatita, sendo que alguns espécimes exibiram diferentes graus de regeneração óssea, que se relaciona com a composição porcentual da hidroxiapatita. Aos 18 meses, 86% e 91% dos grânulos de hidroxiapatita estavam completamente circundados por osso nos espécimes que receberam implante constituído de 25% e 50% de hidroxiapatita, respectivamente. Já nos espécimes que receberam implante de 75% e 100% de hidroxiapatita houve encapsulamento ósseo de 75% e 66% dos grânulos, respectivamente. Baseado nestes resultados, os autores indicaram o uso de grânulos de hidroxiapatita densa associada a osso autógeno, na proporção de 3:1 a 1:1 (osso autógeno e hidroxiapatita), para cirurgias ósseas reconstrutivas.

Lehtinen et al.⁴⁸ (1990) realizaram cinco cavidades medindo três milímetros, em cada uma das tíbias de cinco coelhos. Uma das cavidades permaneceu vazia, servindo de controle e as outras quatro cavidades foram preenchidas cada uma com quatro diferentes hidroxiapatitas, cujas partículas possuíam diferentes formas e o tamanho de cada partícula variava de 0,42 a 1mm. Os coelhos foram sacrificados nos períodos de quatro semanas, seis semanas, dois, quatro e seis meses após a cirurgia. As tíbias foram fixadas, descalcificadas e embebidas em parafina, sendo posteriormente seccionadas, coradas por hematoxilina e eosina e estudadas por microscopia de luz. Foi observado pelos autores que todas as partículas causaram uma moderada resposta inflamatória, que desapareceu em dois meses. A linha entre o osso original e o osso neoformado permaneceu visível até o período de seis

meses e não houve diferença no padrão de regeneração entre os vários tipos de produtos utilizados. Desta forma, os pesquisadores afirmaram que quando cavidades ósseas são preenchidas com partículas de hidroxiapatita, a forma e o tamanho destas partículas não interferem no processo de reparo.

Granjeiro et al.³⁵ (1992) avaliaram diferentes hidroxiapatitas de uso clínico, nacionais e importadas, a fim de descreverem suas características físico-químicas, utilizando microscopia óptica e eletrônica de varredura, espectrometria de infravermelho, difração e fluorescência de raios-X e determinação da concentração de cálcio e fosfato. As hidroxiapatitas avaliadas foram: a) Biohidroxi-Inodon, sintetizada no Departamento de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, através de uma técnica de precipitação branda de solução de cloreto de cálcio e fosfato de sódio, sendo o precipitado filtrado e secado a 100°C por 12 horas; b) Osteosynt, produzida pela Einco Ltda; c) HA-40, produzida pela Homus-Ind. Com. Ltda, lote números 11802 e 12604; d) Osteogen, produzida por GBD marketing Group Inc. (importada); e HA-padrão, Sigma Corporation, lote número H-0252. Os autores explicaram que a obtenção de um material que fosse totalmente biocompatível e reabsorvível os levou a analisar as diferentes marcas de hidroxiapatitas disponíveis no mercado, seguindo parâmetros que permitissem avaliar o grau de pureza, a forma, o tamanho das partículas, a composição química e a capacidade de dissolução. Os resultados encontrados pelas diferentes técnicas de análise levaram os autores a concluir que todos os materiais apresentavam características da hidroxiapatita, com exceção da HA-40, que mostrou impureza quando analisada pela espectrometria de transmissão de infravermelho e fluorescência de raios-X. A Biohidroxi-Inodon foi o único material testado cujas propriedades permitiram a sua reabsorção pelo mecanismo de fagocitose.

Oliveira et al.⁶⁰ (1993) discutiram vários trabalhos que vêm demonstrando a configuração, a forma e o processo de síntese das partículas das hidroxiapatitas utilizadas com material de implante e consideraram que estes afetam a biodegradação e/ou dissolução, determinando uma resposta tecidual específica.

Yamamoto et al.⁹³ (1994) avaliaram histologicamente a resposta tecidual óssea, frente à hidroxiapatita granular implantada em defeitos criados na mandíbula de ratos. Foram utilizados trinta ratos adultos machos (*Rattus norvegicus albinus*), nos quais foram criados defeitos ósseos transcorticais por meio de uma broca esférica de 2,5mm de diâmetro, no lado esquerdo e no lado direito, na região do ângulo da mandíbula. No lado direito, o defeito foi preenchido com grânulos de hidroxiapatita (HA-40, Homus Ind. Com. Ltda.) e o lado esquerdo permaneceu sem a utilização do material, servindo como controle. Os animais foram distribuídos em seis grupos de cinco ratos cada e sacrificados em períodos de 24 horas, sete dias, 15 dias, um mês, três meses e seis meses. Os pesquisadores concluíram que o processo inflamatório agudo ocorreu de imediato à implantação da hidroxiapatita, observado em 24 horas e a seguir, ocorreu processo inflamatório crônico observado em sete dias, nos dois grupos experimentais; que houve uma reação do tipo corpo estranho, devido à presença de células gigantes no grupo com a hidroxiapatita, observada em 15 dias, que persistiu até o período final do experimento, em seis meses. Limitada atividade osteoblástica foi observada ao redor do defeito ósseo nos períodos finais do experimento, em ambos os grupos. Os autores descreveram que a neoformação óssea ficou restrita aos cotos ósseos, não preenchendo a cavidade e explicaram que este achado provavelmente ocorreu devido à presença da reação do tipo corpo estranho que se desenvolveu junto ao material implantado. Por fim, apontaram que, apesar da hidroxiapatita ser preconizada por vários autores como indutora de neoformação óssea,

neste trabalho não ocorreu promoção da reparação óssea pelo uso deste material.

Rosa et al.⁷⁰ (1995) compararam pela análise histomorfométrica o comportamento biológico de uma hidroxiapatita microgranular (MIC), de uma hidroxiapatita em partículas (HA 40) e do tricálcio fosfato (TCP) implantados em alvéolos dentários de ratos. Todos os três materiais retardaram o reparo alveolar quando comparado ao grupo controle, pois uma quantidade menor de osso neoformado foi detectada durante o período de estudo. Os autores destacaram ainda que nos grupos MIC e TCP o processo inflamatório desapareceu durante a terceira semana de estudo, enquanto no grupo HA 40 a resposta inflamatória persistiu. Os autores justificaram a melhor biocompatibilidade de MIC e TCP pelo comportamento biológico desses materiais, pois estes permaneceram na forma de partículas e foram envolvidos rapidamente pelo tecido conjuntivo durante o processo de reparo.

Veeck et al.⁸³ (1995) realizaram um trabalho experimental em fêmures de ratos e analisaram o comportamento do osso e da medula óssea, frente a implantes de hidroxiapatita densa, hidroxiapatita em grânulos (Calcitite) e lâminas de titânio puro. De acordo com a metodologia estabelecida, os animais foram sacrificados nos períodos de sete, 21, 45, sessenta e noventa dias, contados a partir da colocação dos implantes. Ao exame histológico, em cortes corados pela hematoxilina e eosina, visualizados em microscópio óptico, os autores verificaram a formação e remodelação óssea ao redor dos dois tipos de implantes e deduziram que ambos são biocompatíveis. Além disso, pela quantidade e expansão da matriz e conseqüente mineralização, constataram a osteocondutibilidade da hidroxiapatita.

Higashi & Okamoto³⁸ (1996) estudaram a influência do tamanho das partículas de biomateriais na reação celular e na proliferação celular. Duas hidroxiapatitas, uma densa e outra porosa, obtidas por diferentes processos foram selecionadas e dois tamanhos de

partículas de 300µm e 40µm foram usados para examinar a reação celular. Cada um dos quatro materiais foi colocado em cultura de fibroblastos derivados da polpa dental, por um período de sete dias. Decorrido este tempo, as partículas de hidroxiapatita densa de 300µm estavam completamente recobertas por células que proliferaram sobre sua superfície. Por outro lado, as partículas densas e porosas da hidroxiapatita de 40µm foram capturadas ou envolvidas pelas células, que pareceram não proliferar. As partículas de hidroxiapatita porosa de 300µm ficaram circundadas por numerosos pedaços partidos da sua superfície e as células proliferaram somente ao redor das partículas maiores. Baseado nos resultados, as partículas de hidroxiapatita densa de 300µm foram consideradas mais apropriadas como um biomaterial.

Ruano et al.⁷¹ (1996) investigaram a biocompatibilidade da hidroxiapatita *in vitro*, propondo estudar o crescimento e viabilidade de fibroblastos crescidos sobre substrato contendo hidroxiapatita. Os autores notaram que as células cresceram em íntimo contato com os cristais de hidroxiapatita.

Barbara et al.⁴ (1997) apresentaram uma revisão de literatura sobre o emprego de implantes dentais com cobertura de hidroxiapatita. Os autores destacaram que esses implantes apresentam superfícies bioativas, com a presença de material biocompatível aumentando ou estimulando a formação de novo tecido e, no caso específico de implantes orais promovem a união do osso ao implante. O uso de implantes cobertos por hidroxiapatita introduziu um novo tipo de interface, onde se observa uma união química do osso e superfície do implante, além da retenção mecânica obtida pela proximidade do osso com o implante. Esses implantes são confeccionados através da aplicação por plasma *spray* de uma camada de hidroxiapatita de 50 a 75µm de espessura, sobre o corpo metálico do implante. Essa hidroxiapatita resulta em uma superfície altamente biocompatível e não-reabsorvível. Os autores chamaram atenção para futuros estudos que

esclareçam a estabilidade a longo prazo da união destas superfícies com o tecido ósseo.

Argento³ (1998) analisou histologicamente a reparação do tecido ósseo, a resposta inflamatória e a presença de hidroxiapatita, por meio de estudo experimental em ratos, que receberam implantes de dois diferentes tipos de hidroxiapatita, uma absorvível (Bioapatita[®]) e outra não-absorvível (Interpore 200[®]), em defeitos ósseos criados cirurgicamente nos fêmures dos ratos. O autor verificou que ambas as hidroxiapatitas retardaram a reparação da cavidade óssea, sendo que a hidroxiapatita absorvível provocou reação de corpo estranho. Com a utilização da hidroxiapatita não-absorvível não foi observada a presença de infiltrado inflamatório e ela manteve-se estável durante todo o período experimental. O material absorvível utilizado neste estudo provocou um retardo no processo de reparação, sem benefício adicional. Foi sugerido que se o objetivo da terapêutica é apenas o preenchimento, o material não-absorvível deve ser eleito.

Ito et al.³⁹ (1998) compararam o grau de osteointegração de implantes dentais de titânio revestidos e não revestidos com hidroxiapatita em defeitos ósseos criados cirurgicamente. O estudo foi realizado em tíbias de coelhos e o período de observação foi de quatro meses. Os espécimes foram preparados e analisados histomorfometricamente. Os resultados demonstraram que os espécimes que receberam os implantes de titânio revestidos com a hidroxiapatita apresentaram uma maior quantidade de superfície osteointegrada.

Boeck et al.⁹ (1999) estudaram histopatologicamente o comportamento de uma hidroxiapatita particulada em alvéolo do incisivo superior direito de ratos. Os resultados mostraram que a hidroxiapatita produziu um atraso na cronologia do processo de reparo alveolar em comparação aos animais controle, uma vez que menos tecido ósseo foi formado ao longo de todos os períodos estudados. Além disso, o material

utilizado apresentou compatibilidade biológica, pois foi integrado ao tecido ao longo do processo de reparo.

Caria¹¹ (1999) produziu uma falha óssea na pré-maxila de ratos e implantou hidroxiapatita pura nestas falhas. A hidroxiapatita usada neste estudo foi sintetizada pelo Instituto de Química da UNICAMP, pelo método de precipitação, a partir de uma suspensão de hidróxido de cálcio e uma solução de ácido fosfórico. Após a análise dos resultados, o autor concluiu que a hidroxiapatita que vem sendo desenvolvida pelo Instituto de Química da UNICAMP apresenta biocompatibilidade, oferecendo estabilidade ao local operado, permitindo o crescimento ósseo para o interior da falha produzida, tornando-se um possível substituto para enxerto ósseo autógeno. O osso neoformado manteve contato direto com a hidroxiapatita implantada, sem interposição de tecido conjuntivo.

Rogero et al.⁶⁹ (1999) relataram que os compostos de cálcio e fósforo vêm sendo usados com biomateriais nas áreas médica e odontológica para substituir tecido ósseo. Fosfato de cálcio, hidroxiapatita sintética e hidroxiapatita natural de osso bovino são obtidos por vários e diferentes processos. Os autores avaliaram o efeito tóxico destes compostos, por meio de testes de citotoxicidade, pelo método quantitativo de supressão de colônia, no qual a cultura de células ficou em contato com extratos diluídos destes materiais biocerâmicos. Os resultados mostraram que somente a hidroxiapatita natural proveniente do osso bovino apresentou um efeito citotóxico. Por outro lado, a hidroxiapatita sintética (obtida pelo método de precipitação) e o fosfato de cálcio (obtido pela reação sólida) não são citotóxicos.

Chang et al.¹² (2000) realizaram um trabalho experimental para avaliar a resposta histológica e o efeito de reforço do crescimento de osso, no interior dos poros de implantes de seis diferentes hidroxiapatitas porosas, dependendo da variação da forma geométrica dos poros e também do tamanho destes. Após a implantação, os implantes mostraram diferenças histológicas, dependendo da forma geométrica dos poros. Uma

ativa osteocondução foi verificada na hidroxiapatita de poros cilíndricos e paralelos de 50 micras. Evidente remodelação óssea de osso neoformado e de medula óssea no interior dos poros foi verificada nas hidroxiapatitas de poros cilíndricos de 300 e 500 micras. As hidroxiapatitas de poros irregulares e de poros transversais apresentaram maior resistência, após oito semanas da implantação. Os autores concluíram que a hidroxiapatita com poros cilíndricos mostrou-se útil como um material de enxerto devido à sua resistência, facilidade com que o tamanho do poro pode ser controlado, bem como o seu potencial osteocondutor.

Flautre et al.²⁴ (2001) relataram que as características físicas das hidroxiapatitas, como o volume dos poros, sua forma, número e tamanho das interconexões entre os poros influenciam no processo de osteocondução e que para a criação de substitutos ósseos com boas propriedades é necessário um controle perfeito destes parâmetros.

Orlovskii et al.⁶¹ (2002) afirmaram que a hidroxiapatita vem sendo apontada como o material com maior potencial como substituto ósseo, pois apresenta comportamento osteocondutor, é bioreabsorvível e não apresenta efeitos adversos ao organismo. Contudo, os autores discutiram, que o comportamento da hidroxiapatita cerâmica depende de muitos fatores, em particular, da sua composição química e fase de composição, microestrutura, tamanho dos poros e volume destes poros.

Specchia et al.⁷⁹ (2002) estudaram a relação entre o tamanho dos poros de hidroxiapatita com o seu potencial de osteocondução. A osteocondução, a adesão, a proliferação e a diferenciação celular foram avaliadas de acordo com o crescimento celular em culturas de células de osteoblastos com discos de hidroxiapatita com diferentes porosidades (20%, 40% e 60% de porosidade). Os autores verificaram neste estudo *in vitro*, que a porosidade da hidroxiapatita afetou a proliferação e a diferenciação

celular, sendo que a maior porosidade foi associada a uma diminuição na população celular.

Gerber et al.³¹ (2003) estudaram dois tipos de fosfatos de cálcio cerâmicos: a hidroxiapatita SiO_2 contendo cerâmica e a hidroxiapatita β tricálcio-fosfato SiO_2 contendo cerâmica. Os materiais foram confeccionados em forma de roscas com um milímetro de diâmetro. As cerâmicas de fosfato de cálcio mencionadas estabelecem uma interconexão da estrutura dos macroporos que são responsáveis pelo crescimento do osso e pela substituição da cerâmica por osso. Experimentos *in vivo* foram realizados e observados no período mínimo de cinco semanas e por um período máximo de oito meses. Os resultados após o menor período de observação mostraram os estágios precoces da formação óssea e da dissolução do material. Aos seis meses, aproximadamente cem por cento da cerâmica implantada estava reabsorvida e novo osso ao redor do local da intervenção estava formado.

Singh et al.⁷⁶ (2004) descreveram um estudo sobre o acompanhamento, por dez anos, de 33 pacientes com menos de cinquenta anos, que apresentavam distúrbios ósseos (como osteoartrite) na articulação do quadril e que receberam próteses cobertas com cerâmica de hidroxiapatita e encaixadas no interior do fêmur. Radiograficamente, os autores detectaram, após um ano, o desaparecimento da linha radiolúcida que delimitava o aparato, sugerindo a formação óssea nesse espaço e a osteointegração do implante. Os autores concluíram que o sistema prótese-hidroxiapatita apresentou excelentes resultados clínicos e radiográficos em pacientes jovens, ativos e com diferentes distúrbios ósseos no quadril.

Tieliewuhan et al.⁸¹ (2004) desenvolveram um novo biomaterial a base de CO_3 -apatita sintética misturada com gel de colágeno, apresentado na forma de esponja, e envolvido por uma estrutura constituída por hidroxiapatita. Estudos, em cultura de osteoblastos, mostraram crescimento celular no interior da esponja e a

deposição de matriz tecidual na mesma. Estudos, *in vivo*, em ossos do crânio de ratos, após implantação do material abaixo do periósteo, demonstraram neoformação óssea a partir da superfície periosteal em direção ao interior do biomaterial. Os autores sugerem o uso terapêutico desse biomaterial como substituto ósseo.

Xie et al.⁸⁸ (2004) avaliaram o efeito da hidroxiapatita sobre os osteoblastos, através da análise da expressão gênica dessas células frente a discos de hidroxiapatita e discos-controle de plástico. A hidroxiapatita aumentou a expressão gênica dos osteoblastos em relação a dez genes e diminuiu a ativação de 15 regiões gênicas, dentro de um período de 24h. Os autores detectaram alterações em genes de osteoblastos relacionados com a aderência, proliferação e síntese de matriz extracelular e sugerem que um grupo de genes responsivos para a hidroxiapatita deve contribuir para a diferenciação de osteoblastos.

Kim et al.⁴⁵ (2005) desenvolveram uma hidroxiapatita porosa coberta por partículas de hidroxiapatita e por antibiótico (vancomicina). O antibiótico foi liberado mais regularmente quando estava presente na cobertura da hidroxiapatita e rapidamente quando se apresentava adsorvido ao material. A hidroxiapatita coberta mostrou melhores resultados quanto à resistência a compressão, quando comparada a hidroxiapatita sem cobertura, mas se apresentou com menor porosidade. Os autores sugeriram a utilização desse material em casos de reparação óssea pela facilidade da liberação do antibiótico.

2.3 Bisfosfonatos e hidroxiapatita

Poucos são os trabalhos encontrados na literatura que estudaram e analisaram o uso concomitante dos bisfosfonatos e da hidroxiapatita, em especial do alendronato sódico associado a hidroxiapatita sintética.

Meraw et al.⁵⁶ (1999) com o objetivo de determinarem os efeitos do alendronato sódico aplicado localmente na regeneração óssea guiada ao redor de implantes dentários, realizaram um trabalho utilizando seis cães adultos e implantaram nestes animais quatro diferentes tipos de implante, sendo implante de hidroxiapatita revestido por alendronato, de titânio revestido por alendronato, de hidroxiapatita e de titânio. A implantação foi realizada nos alvéolos dos segundos, terceiros e quartos premolares mandibulares, no lado esquerdo e direito, imediatamente após a extração destes dentes. Os implantes foram protegidos por uma membrana de colágeno reabsorvível. Após 28 dias os animais foram sacrificados e a neoformação óssea foi mensurada por um microscópio computadorizado digitalizado. Os resultados indicaram um efeito significativo da aplicação local do alendronato com ambos os tipos de implante (hidroxiapatita e titânio). Desta maneira, foi concluído que o alendronato aumentou a velocidade da formação óssea ao redor dos implantes e resultou em um maior contato osso/implante nos espécimes de titânio.

Meraw & Reeve⁵⁵ (1999) realizaram um experimento, seguindo a mesma metodologia descrita no trabalho acima, porém neste estudo o objetivo foi analisar a influência do alendronato sódico aplicado localmente na regeneração óssea precoce sob o ponto de vista da qualidade do osso periférico aos implantes. Os autores observaram que o alendronato causou um aumento significativo de osso na área periférica ao redor dos implantes. Entretanto, o fator que mais influenciou na

quantidade de osso formado foram as características das superfícies dos implantes.

Denissen et al.¹⁸ (2000) incubaram implantes de hidroxiapatita porosa em uma solução de bisfosfonato a 10^{-2} M e em pH de 3,49 e 7,32. Os implantes possuíam diâmetro de 2,1mm e altura de 2mm e adsorveram 115 microgramas de bisfosfonatos *in vitro*. Estes implantes foram inseridos na tíbia de 35 ratos. Os resultados histológicos mostraram que todos os implantes de hidroxiapatita/bisfosfonato estavam completamente integrados ao tecido ósseo e demonstraram serem efetivos como material de substituição deste tecido em tíbias de ratos. Ainda exibiram poder de osteocondução para o osso da tíbia, que se neoformou ao redor e no interior da estrutura porosa dos implantes. Adicionalmente pode-se também observar grande quantidade de vasos sanguíneos neste local.

Denissen et al.¹⁷ (2000) utilizando o mesmo complexo de hidroxiapatita e bisfosfonato descrito em seu trabalho supracitado, implantaram este material em alvéolos de cabras. Em uma hemimandíbula implantaram hidroxiapatita pura e no outro lado implantaram o complexo hidroxiapatita/bisfosfonato. Comparando histologicamente os dois implantes, os autores verificaram que a hidroxiapatita/bisfosfonato demonstrou uma maior integração ao osso alveolar, demonstrando um potencial de osteocondução elevado, quando comparado ao implante de hidroxiapatita pura.

Yoshinari et al.⁹⁴ (2001) analisaram o efeito tóxico sobre osteoblastos e o efeito inibitório na aderência de *Porphyromonas gingivalis* de titânios cobertos por uma delgada camada de hidroxiapatita, e tratados com bisfosfonatos (pamidronato) retidos na superfície do implante. O bisfosfonato foi usado pela sua afinidade por fosfato de cálcio e por inibir a reabsorção óssea. Os autores perceberam que esse tipo de titânio não provocou efeito citotóxico em osteoblastos e ainda inibiu a aderência bacteriana. O bloqueio da aderência bacteriana foi explicado

pela alteração na carga elétrica na superfície do titânio. Os autores concluíram que a combinação hidroxiapatita e bisfosfonato sobre o titânio pode ser útil em implantes dentários.

Ganguli et al.³⁰ (2002) mostraram a preocupação existente com a perda asséptica de implantes devido a osteólise em resposta à pressões estressantes ou à reação celular a detritos do revestimento de implantes. Os autores discutiram se os bisfosfonatos por serem inibidores da reabsorção óssea osteoclástica e por se ligarem avidamente a hidroxiapatita poderiam minimizar a resposta osteolítica que gera a perda do implante. Os efeitos do pamidronato, clodronato e etidronato em solução e como cobertura da hidroxiapatita foram investigados sobre os osteoblastos *in vitro*. O pamidronato inibiu a síntese de colágeno quando em solução, mas não depois de ligado a hidroxiapatita. Quando ligado a hidroxiapatita, pamidronato e clodronato aumentaram a síntese de DNA e de colágeno por osteoblastos e favoreceram a osteointegração de implantes. O etidronato alterou a distribuição da actina do citoesqueleto celular. Os autores concluíram que deve ser estudado se os efeitos inibitórios dos bisfosfonatos sobre osteoclastos e macrófagos continuam mesmo depois de ligados a hidroxiapatita.

Fernandes et al.²³ (2004) avaliaram a ação do alendronato sódico e a sua associação com hidroxiapatita pura granular na reparação de defeitos ósseos. Os autores utilizaram 27 coelhos adultos, nos quais foi criado um defeito na cortical óssea externa do corpo da mandíbula, medindo 4,25mm de diâmetro. Os animais foram divididos em três grupos: controle, alendronato e alendronato mais hidroxiapatita. Nos animais do grupo controle foi somente confeccionado o defeito ósseo, permanecendo o defeito apenas preenchido pelo coágulo sangüíneo proveniente da própria ferida. O grupo de animais do grupo alendronato, bem como os animais do grupo alendronato mais hidroxiapatita, receberam 1mg/kg/dia de alendronato sódico por via oral, durante dez dias consecutivos após a

cirurgia. Os animais do grupo alendronato mais hidroxiapatita, além de serem medicados com o alendronato sódico, como citado acima, também tiveram o defeito preenchido com a hidroxiapatita granular pura sintética. Os animais foram sacrificados 14, 21 e 28 dias após a cirurgia, as mandíbulas foram removidas descalcificadas e seguiram para o processo histológico de rotina. Histologicamente, foram observadas diferenças entre os grupos experimentais, porém estatisticamente, não houve diferença entre os tratamentos, apenas entre os períodos de observação. Os autores chamaram a atenção para o fato de que apesar de não terem ocorrido diferenças estatísticas, a neoformação óssea ocorrida no grupo alendronato comparada à neoformação óssea do grupo alendronato/hidroxiapatita, apresentou uma maior maturação e remodelação, independentemente do período de observação.

3 PROPOSIÇÃO

Estudar a reparação óssea, após a aplicação local do alendronato sódico, da hidroxiapatita e da associação do alendronato sódico com a hidroxiapatita em defeitos ósseos criados em fêmures de ratos de ambos os sexos.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

Esta pesquisa foi realizada seguindo os princípios éticos para a experimentação animal da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos - UNESP, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (Anexo A).

Neste estudo, foram utilizados 168 ratos (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar) sendo 84 fêmeas e 84 machos, com aproximadamente três meses de idade e pesando em média trezentos gramas. Estes animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos - UNESP, onde permaneceram durante toda a etapa experimental em gaiolas coletivas, recebendo tratamento de rotina.

4.2 Divisão dos grupos

Os 168 animais foram divididos em sete grupos constituídos por 24 animais, sendo 12 machos e 12 fêmeas. Os grupos experimentais foram denominados por: grupo controle (C), grupo amido (Am), grupo alendronato - 1mol (A1), grupo alendronato - 2moles (A2), grupo hidroxiapatita - 1mol (HA1), hidroxiapatita - 2moles (HA2) e grupo alendronato + hidroxiapatita - 2moles (A+HA) (Quadro 1).

Quadro 1 - Grupos experimentais, número e sexo dos animais por grupo

Grupo experimental	Nº de animais	Sexo
Controle (C)	24	12♂ - 12♀
Amido (Am)	24	12♂ - 12♀
Alendronato - 1mol (A1)	24	12♂ - 12♀
Alendronato - 2moles (A2)	24	12♂ - 12♀
Hidroxiapatita - 1mol (HA1)	24	12♂ - 12♀
Hidroxiapatita - 2moles (HA2)	24	12♂ - 12♀
Alendronato + hidroxiapatita - 2moles (A+HA)	24	12♂ - 12♀
Total	168 animais	

Todos os animais foram submetidos a uma cirurgia para a confecção de um defeito ósseo, sendo que somente no grupo C, o defeito ósseo permaneceu sem preenchimento de material algum, ficando apenas preenchido pelo coágulo sangüíneo proveniente da própria ferida óssea. No Quadro 2, podemos observar os materiais utilizados para o preenchimento do defeito ósseo e cada um dos grupos experimentais.

Quadro 2 - Grupos experimentais e materiais de preenchimento

Grupo experimental	Material de preenchimento
Controle (C)	Ausente
Amido (Am)	Amido
Alendronato - 1mol (A1)	Alendronato + amido
Alendronato - 2moles (A2)	Alendronato + amido
Hidroxiapatita - 1mol (HA1)	Hidroxiapatita + amido
Hidroxiapatita - 2moles (HA2)	Hidroxiapatita
Alendronato + hidroxiapatita - 2moles (A+HA)	Alendronato + hidroxiapatita + amido

O amido e o alendronato sódico utilizados foram cedidos pela Farmácia Escola da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara - UNESP. A hidroxiapatita utilizada foi a Gen-Phos (Genius, Baumer S.A., Divisão de Biomateriais) que é uma hidroxiapatita absorvível. A apresentação da hidroxiapatita Gen-Phos é de partículas micro granulares (0,25µm a 1,0µm) em frascos esterelizados por radiação gama.

Todos os grupos experimentais foram divididos em dois subgrupos constituídos por seis animais de acordo com os períodos de observação. Os animais de cada um dos subgrupos foram sacrificados nos períodos de sete e 21 dias após a cirurgia (Quadro 3).

Quadro 3 - Divisão dos animais em grupo, tempo de sacrifício e relação do número de animais sacrificados por período

Grupo experimental	Tempo de sacrifício		Nº de animais/ período
Controle (C)	7 dias	21 dias	6♂ - 6♀
Amido (Am)	7 dias	21 dias	6♂ - 6♀
Alendronato - 1mol (A1)	7 dias	21 dias	6♂ - 6♀
Alendronato - 2moles (A2)	7 dias	21 dias	6♂ - 6♀
Hidroxiapatita - 1mol (HA1)	7 dias	21 dias	6♂ - 6♀
Hidroxiapatita - 2moles (HA2)	7 dias	21 dias	6♂ - 6♀
Alendronato + hidroxiapatita - 2moles (A+HA)	7 dias	21 dias	6♂ - 6♀

4.3 Cálculo dos materiais

O cálculo das proporções percentuais dos materiais foi realizado de acordo com o peso molecular (PM) das substâncias utilizadas. O PM da hidroxiapatita é 622g/mol e do alendronato sódico é 325g/mol. No grupo A+HA foi utilizado a proporção de 1:1 mol, isto é, um mol de alendronato e um mol de hidroxiapatita, motivo este que determinou a formação dos demais grupos experimentais de dois moles de alendronato e dois moles de hidroxiapatita. Os cálculos das quantidades em peso/mol das substâncias empregadas foram baseados a partir da hidroxiapatita, uma vez que esta possui o maior PM. Desta forma, para que as quantidades em peso das substâncias dos grupos estudados fossem semelhantes, houve a necessidade de adicionarmos um material como excipiente inerte q.s.p. A substância inerte ao alendronato é o amido. Devido à utilização do excipiente, realizamos também um grupo experimental utilizando apenas o amido para assegurarmos que este não influenciou no processo de reparação óssea, bem como não interferiu na ação do alendronato e da hidroxiapatita.

As quantidades em peso foram calculadas utilizando-se 0,01mol para mensurarmos quantias volumétricas apropriadas ao tamanho do defeito ósseo. Desta maneira, as proporções percentuais das substâncias foram mantidas e estão expressas no Quadro 4.

Quadro 4 - Porcentagem e peso dos materiais utilizados

Material	% do material peso em gramas	% de amido	% total
HA2	100% 12,44g	0%	100%
HA1	50% 6,22g	50% 6,22g	100%
A2	52% 6,5g	48% 5,94g	100%
A1	26% 3,25g	74% 9,19g	100%
A + HA	76% 3,25g + 6,22g	24% 2,97g	100%

Após a determinação da quantidade em peso de cada material, estes foram pesados em uma balança de precisão (AB 204 - Metter Toledo), misturados por meio de uma vigorosa agitação em um saco plástico e, posteriormente, foram armazenados em frascos plásticos.

4.4 Procedimentos cirúrgicos

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala cirúrgica, no Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos - UNESP, cuidadosamente limpa e preparada para as cirurgias. No momento da cirurgia, o operador e o auxiliar estavam devidamente paramentados com avental, gorro, máscara e luvas de procedimento. Todo o instrumental e campos cirúrgicos foram adequadamente esterelizados.

Os ratos foram pesados para calcular a dosagem ideal de anestésico a ser administrada para cada animal. Em todas as cirurgias, utilizou-se para anestesia uma solução aquosa a 2% de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompun - Bayer do Brasil), substância sedativa analgésica e relaxante muscular e, ketamina base (Dopalen - AgribRANDS do Brasil Ind. Com. Ltda.), anestésico geral, respectivamente, na proporção de 1,0ml para 0,5ml. A dosagem da solução injetada foi de 0,1ml/100g por via intramuscular, utilizando-se uma agulha e uma seringa descartável de 1ml.

Após a indução anestésica dos animais, foi realizada a depilação na região do fêmur esquerdo e assepsia da pele utilizando uma solução aquosa de polividona, com 10% de iodo ativo (Hi-Odin - Halex Istar Ltda.), por fricção com gaze estéril presa por uma pinça porta-agulha. A incisão da pele, medindo aproximadamente 2,5cm, foi realizada utilizando-se uma lâmina nº15 montada em bisturi do tipo Bard & Parker, seguindo o sentido do longo eixo do osso. Posteriormente, a pele foi afastada e os músculos da região do terço distal do fêmur esquerdo foram divulsionados e afastados, a fim de expor o tecido ósseo para a confecção do defeito ósseo.

O defeito ósseo foi realizado na região de maior extensão látero-lateral da diáfise do fêmur esquerdo, na sua porção distal. O defeito foi confeccionado utilizando uma broca trefina, medindo 2mm de diâmetro interno e 2,50mm de diâmetro externo, montada em motor tipo chicote, sob abundante irrigação com soro fisiológico (NaCl 0,9%). A broca foi posicionada perpendicularmente ao longo eixo do fêmur e o osso compacto da cortical óssea anterior do fêmur foi cortado de forma circular.

Posteriormente a esta etapa operatória, o defeito ósseo foi lavado com soro fisiológico e seco com gaze estéril e, em seguida, o defeito ósseo foi preenchido de acordo com os materiais descritos no Quadro 2.

Com a utilização de um porta-amálgama as substâncias foram colocadas dentro do defeito e acomodadas com um condensador de amálgama, permanecendo dentro do defeito ósseo e misturando-se ao sangue proveniente da própria ferida cirúrgica (Figura 1).

Por fim, após a confecção dos defeitos ósseos em todos os animais, os tecidos moles foram reposicionados e suturados com fio reabsorvível Catgut nº4 (Cirumédica - Brasil). A pele foi suturada com pontos simples utilizando fio de seda nº4 (Ethincon - Johnson & Johnson).

4.5 Sacrifício

Os animais foram sacrificados decorridos sete e 21 dias da data da cirurgia. Para isto, foram anestesiados e decapitados em guilhotina. O fêmur esquerdo foi retirado e o tecido mole excedente foi cuidadosamente removido. As peças ósseas foram fixadas em uma solução de formol a 10%, permanecendo armazenadas em frascos de vidro, separadas de acordo com o grupo experimental, o tempo de observação e o sexo dos animais.

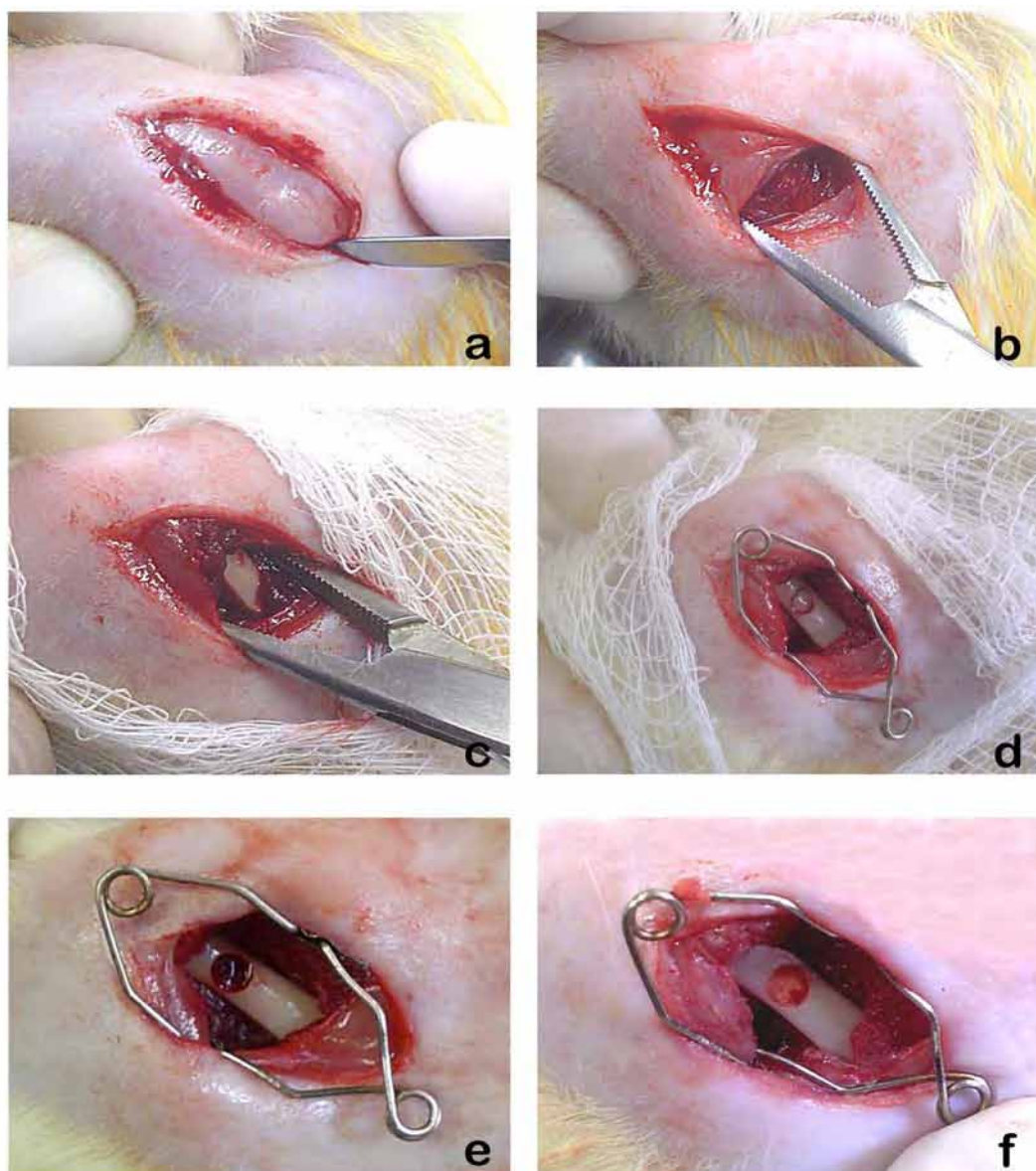


FIGURA 1 - Procedimentos cirúrgicos: a) incisão da pele; b) divulsão dos tecidos moles; c) exposição da superfície óssea do fêmur esquerdo; d) início da confecção do defeito; e) defeito ósseo; f) defeito ósseo preenchido por material.

4.6 Análise dos resultados

Os fêmures esquerdos, depois de fixados na solução de formol a 10%, foram descalcificados em solução de Plank-Rychlo durante aproximadamente noventa dias. As peças ósseas foram aparadas, preparadas para a inclusão em parafina e submetidas à técnica histológica de rotina. Foram realizados cortes transversais do defeito ósseo, com aproximadamente 5 μ m de espessura. As secções foram realizadas em toda a extensão do defeito ósseo de forma semi-seriada. Assim, foram confeccionadas sete lâminas de cada peça óssea, que posteriormente foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE - Merck & Co., Inc.) e analisadas sob a microscopia de luz (Zeiss Axiophot 2 - Carl Zeiss, Oberköchen, Alemanha).

4.6.1 Análise histológica

Foram realizadas avaliações histológicas com relação à neoformação óssea, à presença de trabéculas ósseas imaturas, à remodelação destas trabéculas, à remodelação óssea na superfície de corte, à presença de espaços medulares, bem como à resposta tecidual diante da implantação local do amido, do alendronato sódico, da hidroxiapatita e da associação alendronato sódico mais hidroxiapatita, no tecido ósseo dos fêmures dos ratos.

4.6.2 Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica foi realizada com a utilização de um retículo quadriculado composto por cem pontos de intersecção

resultantes das intersecções entre dez linhas verticais e dez linhas horizontais. Este retículo foi posicionado sobre o centro da imagem histológica do defeito ósseo, com um aumento original de cem vezes para a contagem. Foram considerados todos os pontos de intersecção que estavam sobrepostos ao tecido ósseo neoformado. A contagem foi realizada na região central do defeito ósseo a partir de fotografias digitalizadas dos cortes histológicos, sendo que para cada animal, foram analisados seis cortes. Desta forma, foram analisados seiscentos pontos por animal. Para a planimetria por contagem de pontos foi utilizado o programa Image J (versão 1,32 para *Windows*, de domínio público, do Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, USA). Os valores numéricos obtidos da neoformação óssea foram transformados em porcentagem e submetidos à análise estatística.

4.7 Análise estatística

Todos os dados resultantes da análise histomorfométrica foram submetidos à estatística descritiva e à análise de variância (ANOVA), utilizando como nível de significância a margem de erro de 1%. Foram analisados os sete diferentes grupos experimentais (C, Am, A1, A2, HA1, HA2 e A+HA), os dois períodos de observação (sete e 21 dias) e o sexo dos animais (machos e fêmeas). Os resultados estatisticamente significativos submetidos ao teste de Tukey.

A análise de variância e teste de Tukey foram realizados com a utilização do *software* STATISTICA *for Windows* versão 5.5 (2000 – Analytical Software Co.).

5 RESULTADOS

5.1 Análise histológica

Todos os cortes histológicos são oriundos de fragmentos de fêmures de ratos que foram seccionados transversalmente na região onde foi confeccionado o defeito ósseo. Na análise histológica, se observava toda a extensão do osso cortical do fêmur, o canal medular, o local do defeito ósseo, bem como as superfícies de cortes do mesmo.

As características gerais do tecido ósseo do fêmur das amostras estudadas são de um tecido ósseo compacto maduro, com arranjo organizado demonstrado por lamelas ósseas concêntricas, apresentando osteócitos pequenos, alojados no interior de lacunas achatadas e regularmente distribuídas por toda a extensão do osso. Na porção mais externa da compacta óssea, o osso compacto organizava-se em camadas paralelas e sobrepostas.

Na grande maioria dos cortes, foi possível a visualização de quantidade variável de tecido muscular remanescente ao redor do tecido ósseo. A superfície externa do osso encontrava-se envolta por perióstio que ora circundava toda a extensão periférica do osso, ora encontrava-se interrompido no local do defeito ósseo.

A descrição histológica dos espécimes foi realizada agrupando-se os diferentes períodos de observação e o sexo dos animais. Isto foi feito para facilitar a descrição das características semelhantes entre os cortes histológicos e possibilitar a comparação entre os diferentes grupos experimentais dentro do mesmo sexo e em um mesmo período de tempo. Desta maneira, os resultados foram descritos

obedecendo-se a seguinte ordem: animais machos - sete dias, animais fêmeas - sete dias, animais machos - 21 dias e, por fim, animais fêmeas - 21 dias.

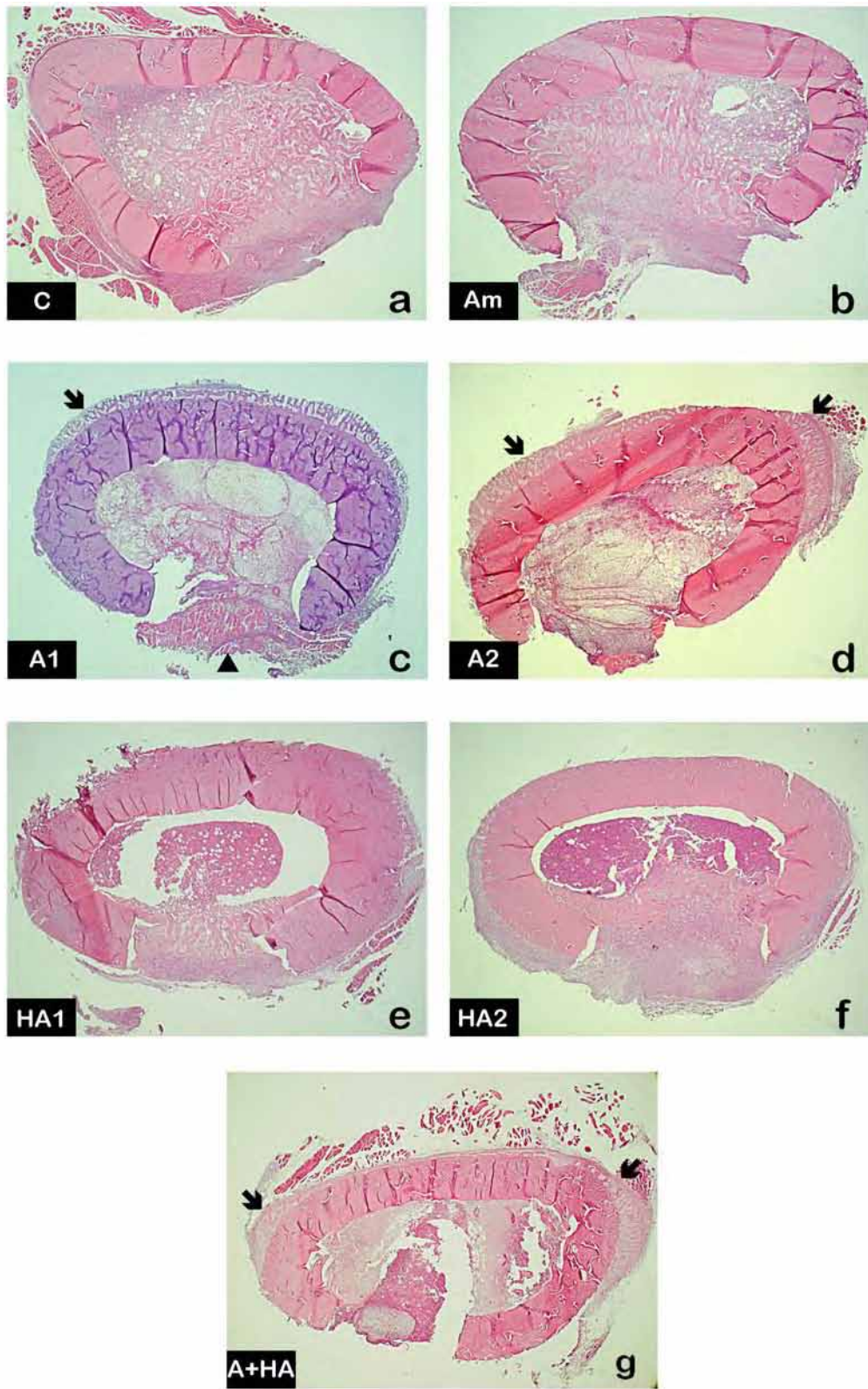
5.1.1 Animais machos - sete dias

Nos cortes histológicos dos animais machos, no período de sete dias observava-se o canal medular preenchido por quantidade variável de medula óssea e células inflamatórias mono e polimorfonucleares. Estas células apresentavam-se em maior número nos grupos A1, A2 e A+HA. Em todos os espécimes, o defeito ósseo era bastante evidente, com as superfícies de corte nítidas (Figura 2).

Nos grupos A1, A2 e A+HA não foi observado neoformação óssea no local do defeito, sendo que este foi preenchido por uma rede de fibrina que também se estendia até o canal medular. Por outro lado, nestes grupos houve neoformação óssea subperiosteal extra-cortical. No grupo A1, a neoformação extra-cortical se localizava na região oposta ao local do defeito ósseo e, nos grupos A2 e A+HA, ela estava presente nas faces medial e lateral do osso (Figura 2c, 2d, 2g; Figura 3c, 3d, 3g).

No grupo A1 foi observado que o perióstio já havia se regenerado sobre toda a superfície externa do defeito ósseo e havia tecido muscular sobre a superfície do defeito, contudo sem promover o rompimento do perióstio (Figura 2c).

Nos espécimes dos grupos C, Am, HA1 e HA2 notava-se a presença de trabéculas ósseas neoformadas, sendo estas menos numerosas nos dois últimos grupos (Figura 2a, 2b, 2e, 2f; Figura 3a, 3b, 3e, 3f). As trabéculas ósseas neoformadas se formaram a partir do endóstio circunvizinho às superfícies de corte. Nos grupos C e Am as

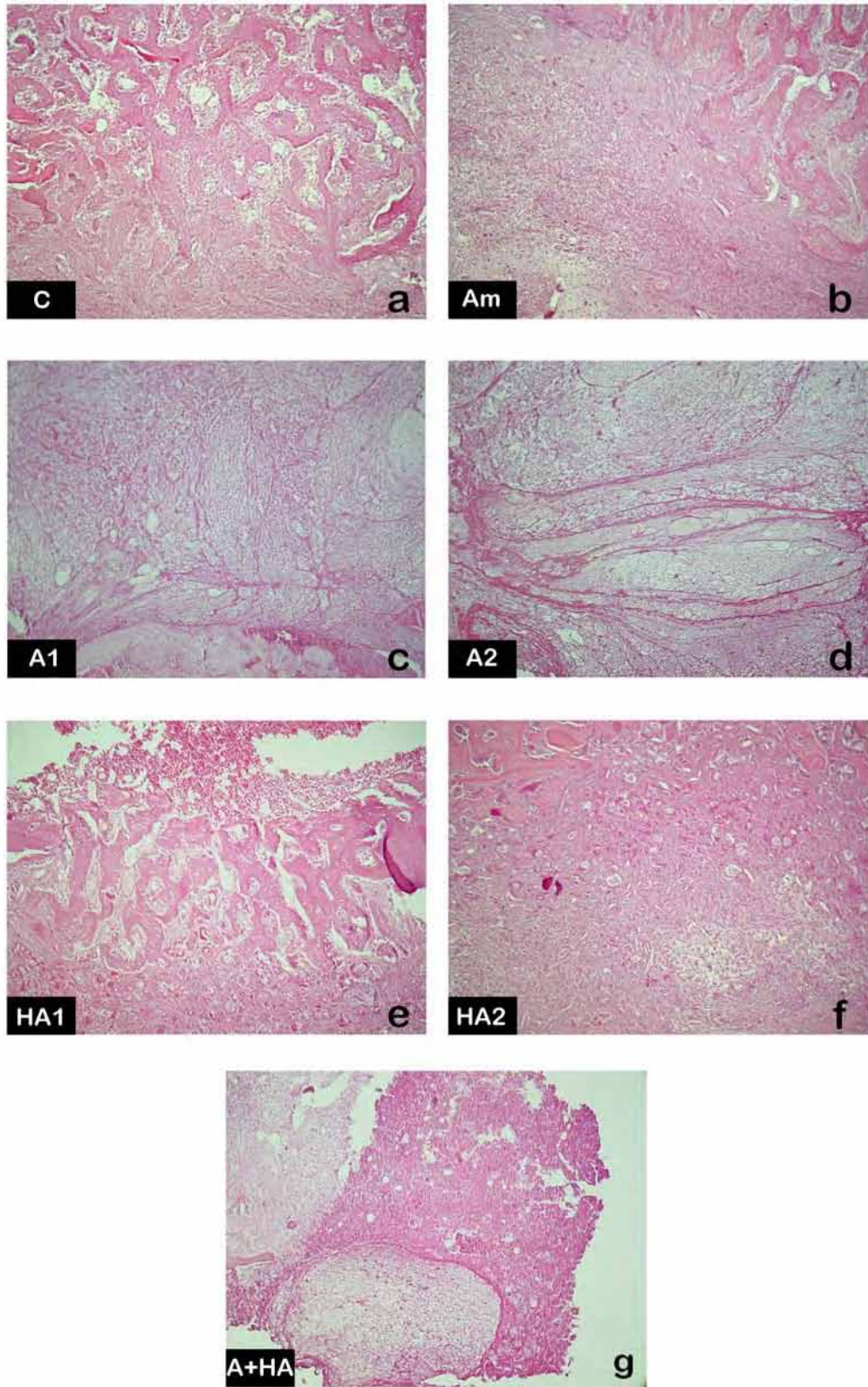


trabéculas se projetavam em direção ao centro do canal medular. Nos grupos HA1 e HA2, a neoformação se dava no sentido do centro do defeito, tendendo a unir suas margens (Figura 2a, 2b, 2e e 2f).

As trabéculas ósseas mostravam-se imaturas e delicadas, por vezes se anastomosavam, sendo circundadas por osteoblastos grandes e volumosos. No interior das trabéculas, havia osteócitos volumosos em grande quantidade, localizados dentro de amplas lacunas. Alguns osteoclastos foram observados na periferia das trabéculas.

Entre as trabéculas, observava-se a presença de amplos espaços medulares preenchidos por tecido conjuntivo frouxo ou por tecido conjuntivo rico em células com aspecto osteogênico. Neste tecido celularizado, por vezes notavam-se focos de tecido osteóide e pequenos centros de ossificação.

Nos grupos HA1, HA2 e A+HA verificava-se a presença de imagens negativas dos grânulos de hidroxiapatita, em quantidade variável, por vezes eram envolvidas por células gigantes multinucleadas (Figura 10a). Não foram encontradas células inflamatórias entre as imagens negativas dos grânulos.



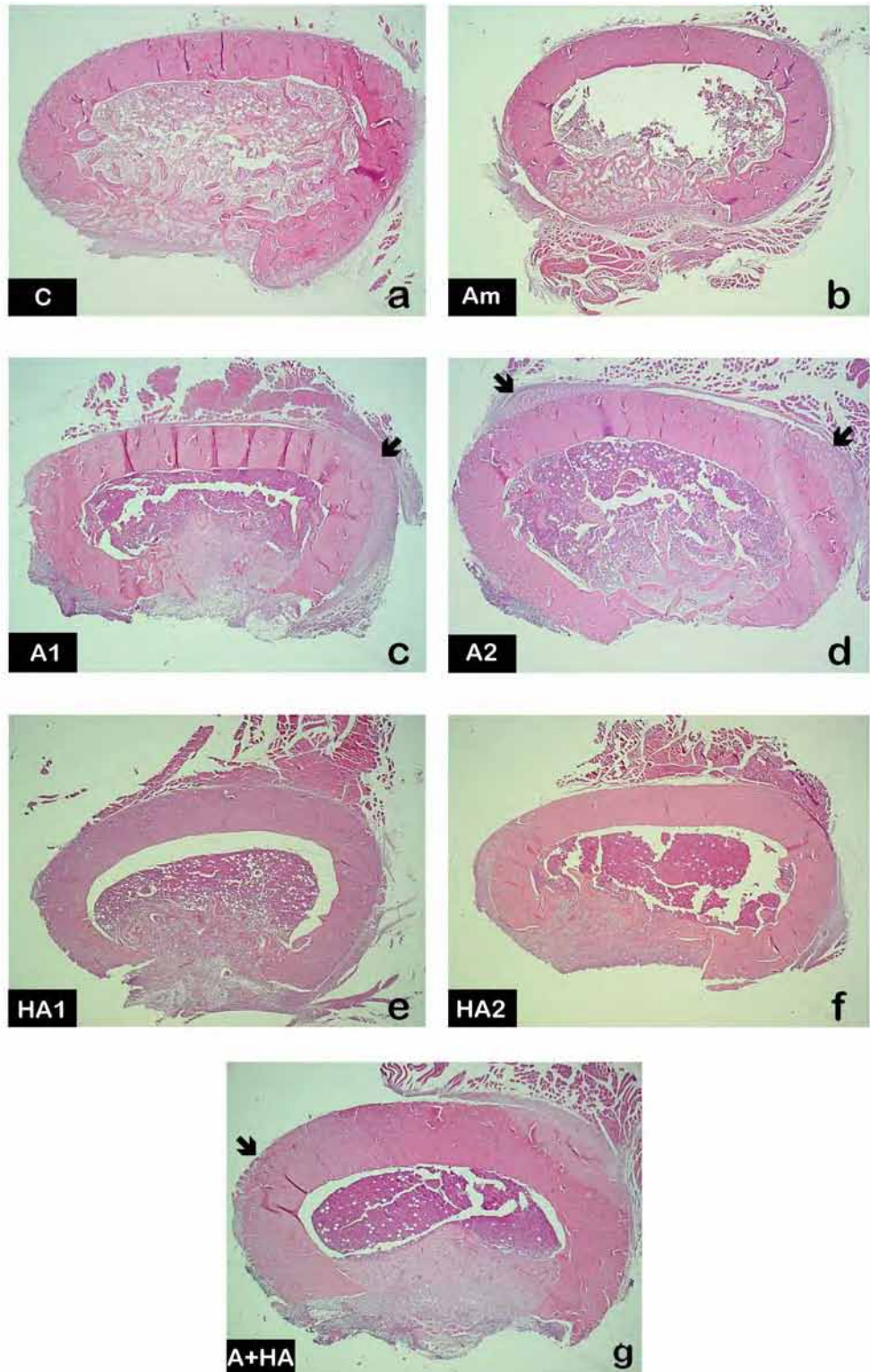
5.1.2 Animais fêmeas - sete dias

Aos sete dias nos animais fêmeas, histologicamente notava-se a presença de diferentes quantidades de medula óssea e de células inflamatórias no interior do canal medular. As células inflamatórias apresentavam-se principalmente na região central do canal medular que na região do defeito ósseo, cuja superfície de corte mostrava-se visível. Em todos os espécimes havia a presença de trabéculas ósseas neoformadas, sendo mais evidente nos grupos C e Am, seguidos pelos grupos A+HA, HA2, HA1, A1 e A2 (Figura 4).

Nos espécimes dos grupos C e Am as trabéculas ósseas neoformadas se anastomosavam ao longo do defeito ósseo, praticamente unindo-o de um lado ao outro, porém sem fechá-lo em extensão. A neoformação ocorreu a partir do endóstio e do perióstio. O perióstio circundava toda a periferia do corte histológico, inclusive recobrimdo o local do defeito ósseo (Figura 4a, 4b).

A distribuição das trabéculas ósseas neoformadas dos grupos C e Am era semelhante (Figura 5a, 5b). Em ambos os grupos, as trabéculas estavam bem delimitadas, apresentavam aspecto imaturo, com a presença de osteócitos volumosos situados no interior de amplas lacunas. Os osteoblastos dispunham-se ordenadamente ao redor das trabéculas ósseas e células com características osteogênicas distribuíam-se entre os amplos espaços medulares delimitados por essas trabéculas (Figura 10b).

Nos grupos A1, A2, HA1, HA2, e A+HA, as trabéculas ósseas apresentavam uma neoformação mais evidente a partir do endóstio e se projetavam discretamente em direção ao canal medular (Figura 4c, 4d, 4e, 4f, 4g; Figura 5c, 5d, 5e, 5f, 5g).

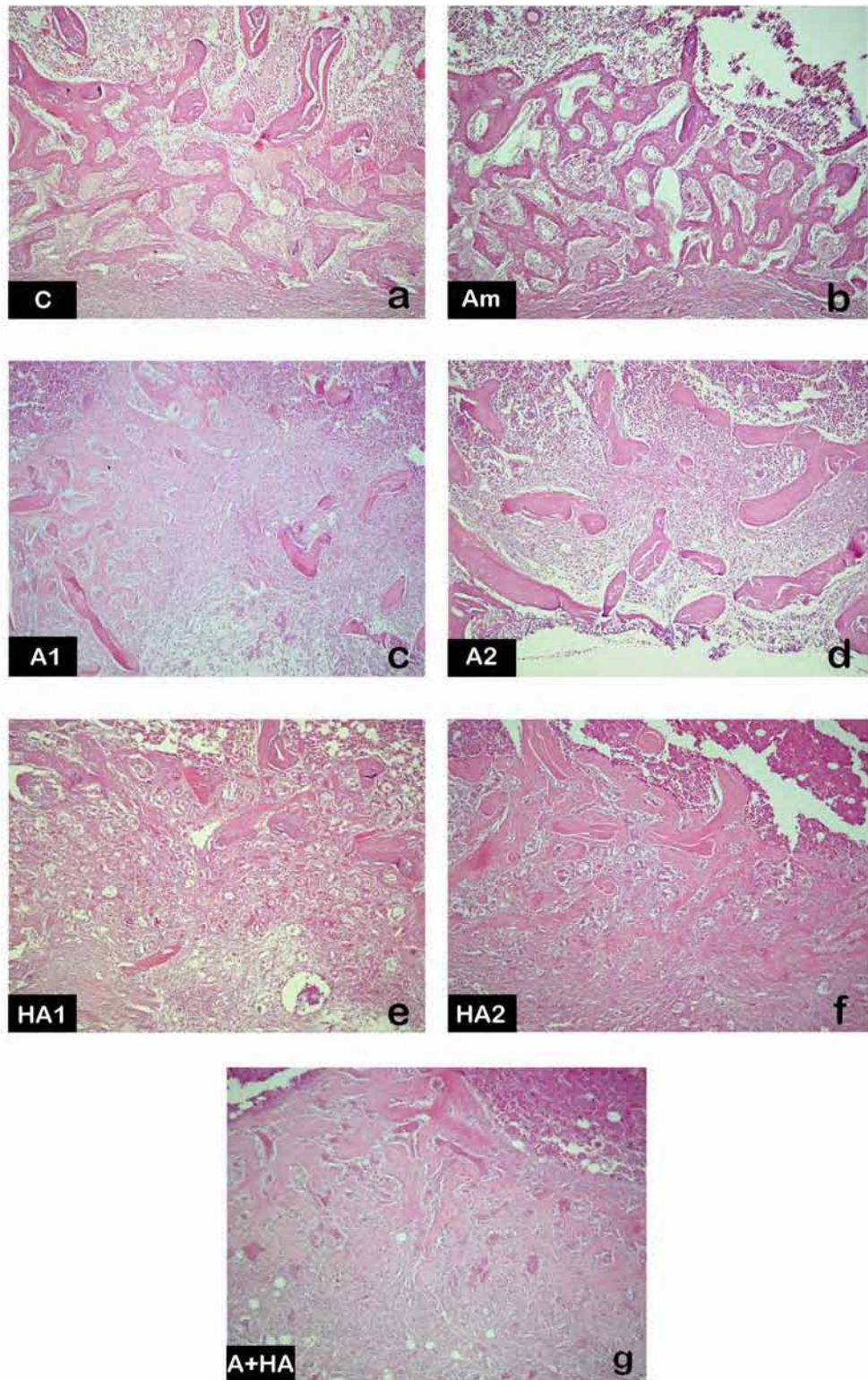


Estas trabéculas mostravam aspecto mais imaturo que as dos grupos C e Am, apresentando contornos menos evidentes e eram circundadas por osteoblastos e tecido de aspecto osteóide que preenchia parcialmente os espaços medulares.

Células inflamatórias foram notadas em maior quantidade nos espécimes dos grupos A1 e A2, tanto no interior do canal medular quanto nas áreas mais próximas ao defeito ósseo e entre as trabéculas ósseas neoformadas.

Nos grupos A1 e A2, bem como no grupo A+HA, observava-se neoformação óssea subperiosteal extra-cortical (4c, 4d, 4g). Esta neoformação óssea dispunha-se nas faces medial e lateral do osso, constituindo uma nova camada óssea, com trabéculas ósseas neoformadas, regularmente distribuídas, delimitando espaços medulares preenchidos por tecido conjuntivo frouxo.

Nos grupos HA1, HA2 e A+HA observava-se as imagens negativas dos grânulos de hidroxiapatita e células gigantes multinucleadas (Figura 10a).



5.1.3 Animais machos - 21 dias

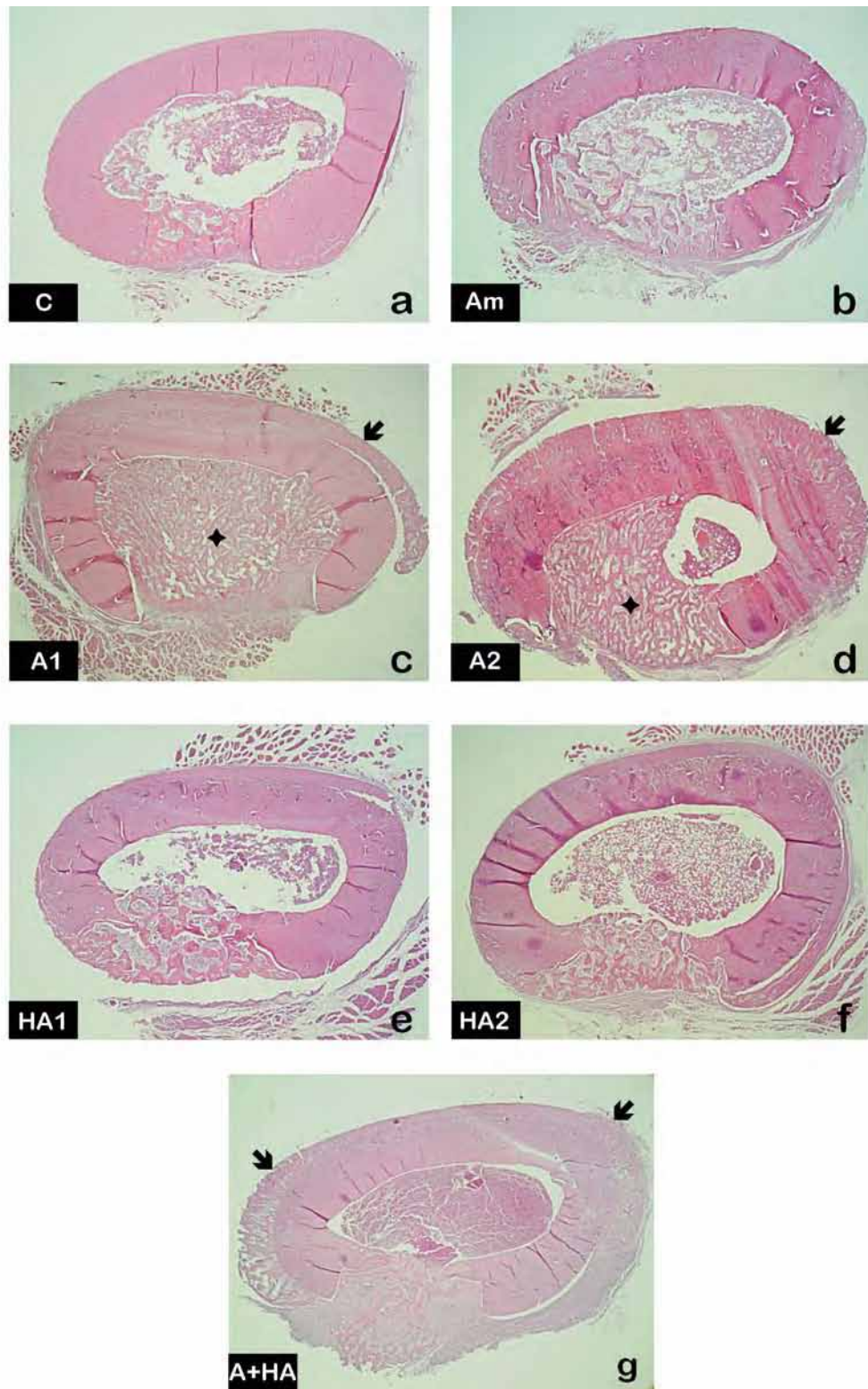
O tecido ósseo formado na região do defeito apresentava maior maturação no período de 21 dias, quando comparado ao observado no período de sete dias. Ainda comparando estes dois diferentes períodos, notava-se uma redução do número de células inflamatórias, principalmente no local do defeito ósseo.

O grupo C apresentou o fechamento do defeito ósseo em toda a sua extensão, com grande quantidade de trabéculas ósseas anastomosadas, unindo as margens do defeito em extensão e preenchendo toda a sua profundidade (Figura 6a; Figura 7a). Estas trabéculas mostravam um aspecto mais maduro, exibindo em seu interior osteócitos achatados localizados em pequenas lacunas e osteoblastos ao seu redor.

Nos espécimes dos grupos Am, HA1 e HA2 os padrões histológicos foram semelhantes, porém as anastomoses entre as trabéculas ósseas foram mais evidentes na superfície externa do defeito ósseo, sendo que na profundidade do defeito, as anastomoses eram mais esparsas e havia espaços medulares mais amplos entre as trabéculas (Figura 6b, 6e, 6f; Figura 7b, 7e, 7f).

Aos 21 dias, nos grupos HA1, HA2 e A+HA não se observava as imagens negativas dos grânulos de hidroxiapatita que podiam ser visualizadas nos mesmos grupos aos sete dias.

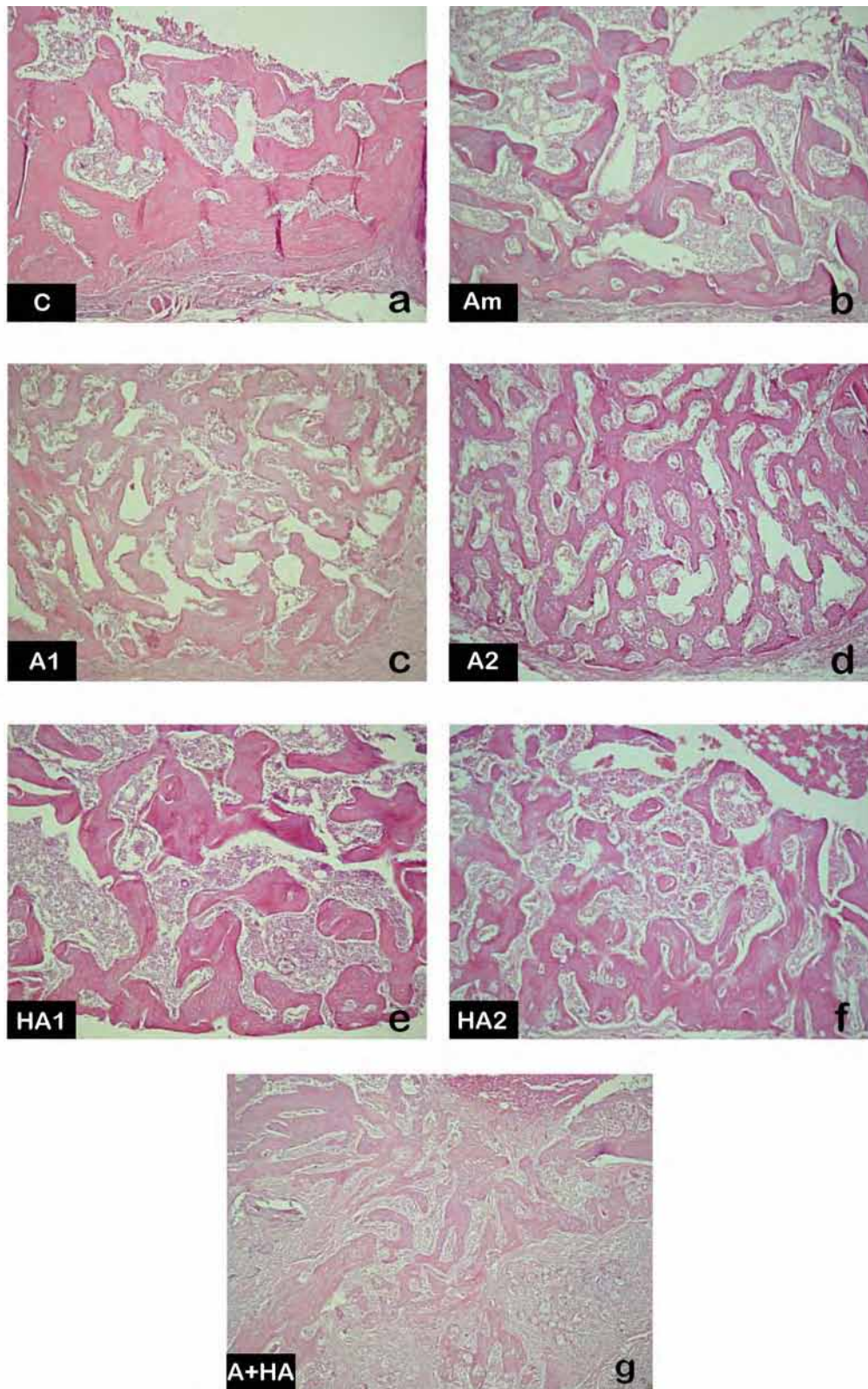
Comparando estes três grupos, notava-se que a neoformação óssea no local do defeito foi menor no grupo A+HA, porém neste grupo houve neoformação óssea subperiosteal extra-cortical na superfície do osso compacto adjacente ao local do defeito ósseo, semelhante ao observado aos sete dias (Figura 6g).



A neoformação óssea verificada nos grupos A1 e A2 apresentou um padrão histológico diferenciado em relação aos demais grupos. Observava-se neoformação óssea subperiosteal extra-cortical evidente (Figura 6c, 6d).

No local do defeito ósseo, era possível se visualizar as superfícies de corte, a neoformação óssea principalmente a partir do perióstio, com trabéculas ósseas que não só se anastomosavam e fechavam o defeito ósseo em extensão, como também se proliferavam intensamente para o interior do canal medular, delimitando espaços medulares preenchidos por tecido conjuntivo frouxo (Figura 7c, 7d).

Em alguns espécimes foi observado o preenchimento de todo o canal medular por trabéculas ósseas anastomosadas que delimitavam espaços medulares preenchidos por quantidade variável de tecido conjuntivo frouxo. Estas trabéculas ósseas apresentavam osteócitos volumosos dentro de amplas lacunas, com osteoblastos e osteoclastos na sua periferia (Figura 10c).



5.1.4 Animais fêmeas - 21 dias

De maneira geral, as características descritas para os animais fêmeas no período de 21 dias foram semelhantes às características observadas nos machos, neste mesmo período. Porém, a neoformação óssea, na região do defeito parece ter sido mais exuberante nas fêmeas que nos machos, independentemente do grupo experimental.

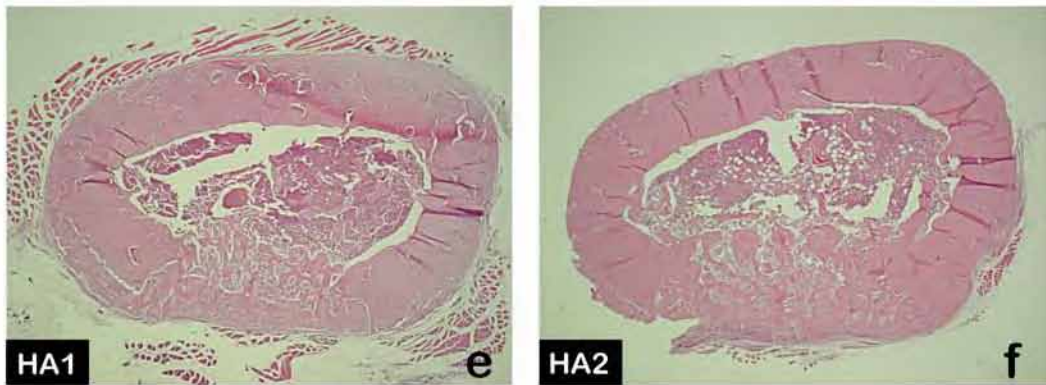
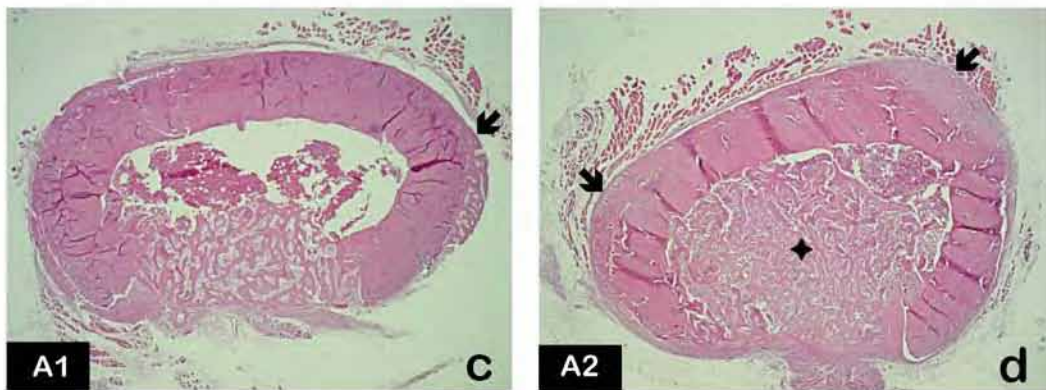
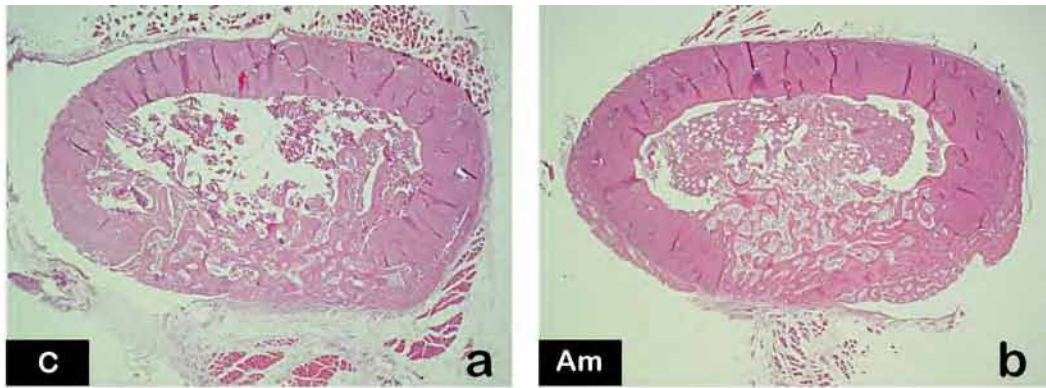
O defeito ósseo, de todos os espécimes, se encontrava fechado aos 21 dias, sendo que na região mais superficial do defeito notava-se uma ponte óssea mais contínua que a observada nos animais machos. As trabéculas ósseas se anastomosavam umas as outras, unindo as margens do defeito em extensão em todos os grupos experimentais (Figura 8; Figura 9).

A superfície de corte, por vezes, se unia intimamente com o osso neoformado, dificultando a observação dos seus limites (Figura 8).

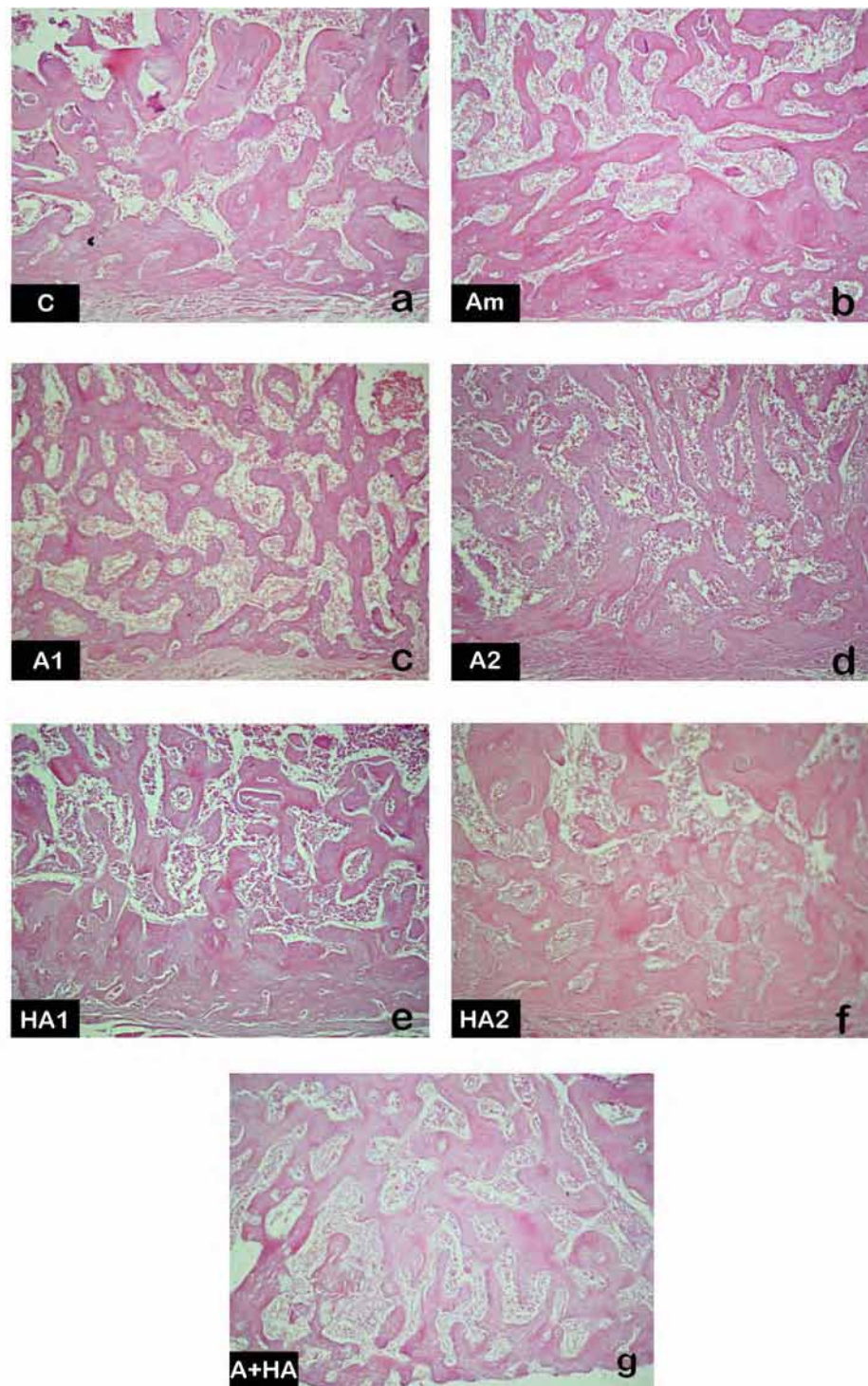
As trabéculas demonstravam sinais de remodelação pela presença de osteoclastos e de linhas reversas de aposição óssea e, apresentavam osteócitos achatados no interior de lacunas (Figura 10d). Os espaços medulares delimitados pelas trabéculas possuíam quantidade variável de tecido conjuntivo frouxo (Figura 9).

Nas fêmeas, como ocorrido nos animais machos, não se observava a imagem negativa dos grânulos de hidroxiapatita nos grupos HA1, HA2 e A+HA.

Nos grupos A1, A2 e A+HA houve neoformação óssea subperiosteal extra-cortical com características histologicamente semelhantes às observadas nos animais machos e fêmeas anteriormente descritos (Figura 8c, 8d, 8g).



No grupo A2, as trabéculas ósseas formadas no defeito se anastomosavam e se proliferavam para o interior do canal medular, preenchendo-o completamente (Figura 8d).



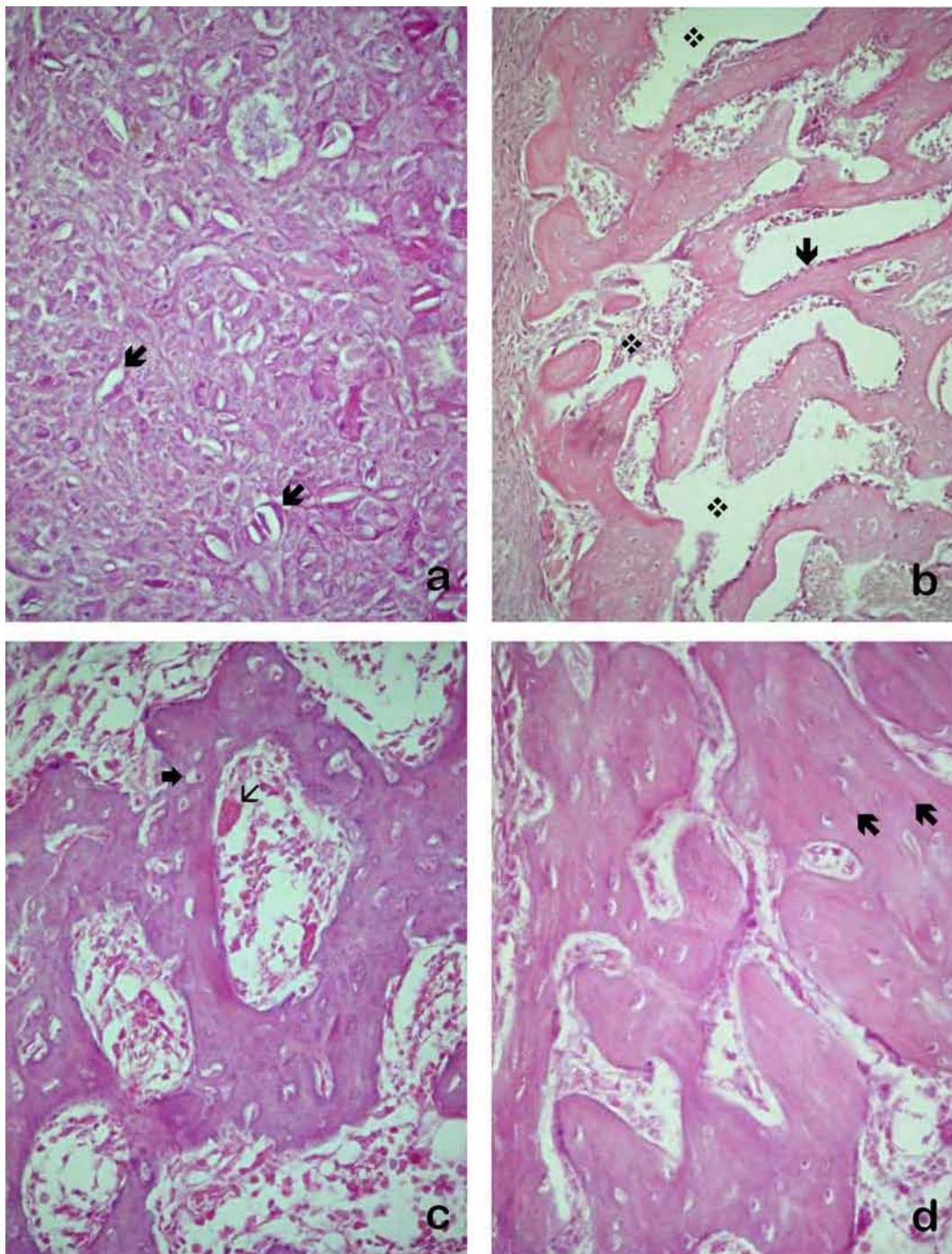


FIGURA 10 - Detalhes histológicos do defeito ósseo: a) imagem negativa do grânulo de hidroxiapatita envolvida por células gigantes multinucleadas (→); b) trabécula óssea circundada por osteoblastos (→) delimitando espaços medulares (❖); c) osteócito volumoso no interior da lacuna (→) e osteoclasto presente no espaço medular (→); d) linhas reversas (→). Aumento original 100x, 100x, 400x e 400x, respectivamente. HE.

5.2 Análise histomorfométrica

A neoformação óssea, quantificada em números absolutos e em porcentagem, ocorrida em cada animal avaliado está apresentada segundo o grupo experimental, o período de observação e o sexo do animal estudado. A Tabela 1 apresenta os dados obtidos no grupo controle (C), aos sete dias, em machos e fêmeas.

Tabela 1 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem* do grupo controle no período de sete dias, macho e fêmea

Grupo	Período (7 dias)			
	Macho		Fêmea	
	P	%	P	%
C	149	0,2483	171	0,285
C	52	0,0867	171	0,285
C	4	0,0067	80	0,1333
C	16	0,1933	144	0,24
C	136	0,2267	170	0,2833
C	88	0,1467	-	-

*%=P/600

As Tabelas 2 a 7 apresentam os dados obtidos aos sete dias, nos animais machos e fêmeas dos grupos amido (Am), alendronato - 1mol (A1), alendronato - 2moles (A2), hidroxiapatita - 1mol (HA1), hidroxiapatita - 2moles (HA2) e alendronato + hidroxiapatita - 2moles (A+HA), respectivamente.

Tabela 2 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem* do grupo amido no período de sete dias, macho e fêmea

Grupo	Período (7 dias)			
	Macho		Fêmea	
	P	%	P	%
Am	138	0,23	170	0,2833
Am	180	0,3	161	0,2683
Am	134	0,2233	261	0,435
Am	82	0,1367	187	0,3117
Am	133	0,2217	136	0,2267
Am	134	0,2233	134	0,2233

*%=P/600

Tabela 3 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem* do grupo alendronato - 1mol no período de sete dias, macho e fêmea

Grupo	Período (7 dias)			
	Macho		Fêmea	
	P	%	P	%
A1	0	0,0	6	0,01
A1	0	0,0	67	0,1117
A1	0	0,0	3	0,005
A1	0	0,0	0	0,0
A1	0	0,0	14	0,0233
A1	0	0,0	18	0,03

*%=P/600

Tabela 4 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem* do grupo alendronato - 2moles no período de sete dias, macho e fêmea

Grupo	Período (7 dias)			
	Macho		Fêmea	
	P	%	P	%
A2	0	0,0	27	0,045
A2	0	0,0	14	0,0233
A2	0	0,0	77	0,1283
A2	0	0,0	50	0,0833
A2	0	0,0	40	0,0667
A2	0	0,0	41	0,0683

*%=P/600

Tabela 5 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem* do grupo hidroxiapatita - 1mol no período de sete dias, macho e fêmea

Grupo	Período (7 dias)			
	Macho		Fêmea	
	P	%	P	%
HA1	106	0,1767	65	0,1083
HA1	121	0,2017	84	0,14
HA1	109	0,1817	91	0,1517
HA1	101	0,1683	169	0,2817
HA1	70	0,1167	59	0,0983
HA1	95	0,1583	93	0,155

*%=P/600

Tabela 6 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem* do grupo hidroxiapatita - 2moles no período de sete dias, macho e fêmea

Grupo	Período (7 dias)			
	Macho		Fêmea	
	P	%	P	%
HA2	87	0,145	153	0,255
HA2	90	0,15	94	0,1567
HA2	99	0,165	93	0,155
HA2	78	0,13	70	0,1167
HA2	86	0,1433	83	0,1383
HA2	91	0,1517	109	0,1817

*%=P/600

Tabela 7 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem* do grupo alendronato + hidroxiapatita - 2moles no período de sete dias, macho e fêmea

Grupo	Período (7 dias)			
	Macho		Fêmea	
	P	%	P	%
A+HA	0	0,0	75	0,125
A+HA	0	0,0	85	0,1417
A+HA	0	0,0	47	0,0783
A+HA	0	0,0	85	0,1417
A+HA	0	0,0	96	0,16
A+HA	0	0,0	98	0,1633

*%=P/600

As Tabelas 8 a 14 apresentam os dados obtidos aos 21 dias, nos animais machos e fêmeas dos grupos controle (C), amido (Am), alendronato - 1mol (A1), alendronato - 2moles (A2), hidroxiapatita - 1mol (HA1), hidroxiapatita - 2moles (HA2) e alendronato + hidroxiapatita - 2moles (A+HA), respectivamente.

Tabela 8 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem* do grupo controle no período de 21 dias, macho e fêmea

Grupo	Período (21 dias)			
	Macho		Fêmea	
	P	%	P	%
C	117	0,195	279	0,465
C	122	0,2033	233	0,3883
C	190	0,3167	254	0,4233
C	150	0,25	155	0,2583
C	108	0,18	240	0,4
C	98	0,1633	237	0,395

*%=P/600

Tabela 9 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem* do grupo amido no período de 21 dias, macho e fêmea

Grupo	Período (21 dias)			
	Macho		Fêmea	
	P	%	P	%
Am	239	0,3983	309	0,515
Am	258	0,43	200	0,3333
Am	189	0,315	193	0,3217
Am	133	0,2217	151	0,2517
Am	134	0,2233	260	0,4333
Am	142	0,2367	262	0,4367

*%=P/600

Tabela 10 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem* do grupo alendronato - 1mol no período de 21 dias, macho e fêmea

Grupo	Período (21 dias)			
	Macho		Fêmea	
	P	%	P	%
A1	7	0,0117	162	0,27
A1	124	0,2067	123	0,205
A1	118	0,1967	209	0,3483
A1	279	0,465	210	0,35
A1	242	0,4033	253	0,4217
A1	154	0,2567	-	-

*%=P/600

Tabela 11 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem* do grupo alendronato - 2moles no período de 21 dias, macho e fêmea

Grupo	Período (21 dias)			
	Macho		Fêmea	
	P	%	P	%
A2	207	0,345	138	0,23
A2	234	0,39	258	0,43
A2	169	0,2817	260	0,4333
A2	25	0,0417	244	0,4067
A2	287	0,4783	242	0,4033
A2	183	0,305	263	0,4383

*%=P/600

Tabela 12 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem* do grupo hidroxiapatita - 1mol no período de 21 dias, macho e fêmea

Grupo	Período (21 dias)			
	Macho		Fêmea	
	P	%	P	%
HA1	174	0,29	301	0,5017
HA1	216	0,36	233	0,3883
HA1	216	0,36	293	0,4883
HA1	214	0,3567	267	0,445
HA1	225	0,375	304	0,5067
HA1	249	0,415	269	0,4483

*%=P/600

Tabela 13 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem* do grupo hidroxiapatita - 2moles no período de 21 dias, macho e fêmea

Grupo	Período (21 dias)			
	Macho		Fêmea	
	P	%	P	%
HA2	199	0,3317	213	0,355
HA2	157	0,2617	232	0,3867
HA2	155	0,2583	271	0,4517
HA2	221	0,3683	277	0,4617
HA2	224	0,3733	272	0,4533
HA2	150	0,25	225	0,375

*%=P/600

Tabela 14 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e seu valor em porcentagem* do grupo alendronato + hidroxiapatita - 2moles no período de 21 dias, macho e fêmea

Grupo	Período (21 dias)			
	Macho		Fêmea	
	P	%	P	%
A+HA	299	0,4983	291	0,485
A+HA	26	0,0433	289	0,4817
A+HA	18	0,3133	310	0,5167
A+HA	179	0,2983	244	0,4067
A+HA	246	0,41	295	0,4917
A+HA	144	0,24	259	0,4317

*%=P/600

A Tabela 15 apresenta os resultados dos valores médios da porcentagem da neoformação óssea segundo cada grupo experimental, nos animais machos e fêmeas, nos períodos estudados.

Tabela 15 - Resultado referente aos valores médios da porcentagem da neoformação óssea, nos períodos de sete e 21 dias, em animais machos e fêmeas

Grupo	7 dias / ♂	7 dias / ♀	21 dias / ♂	21 dias / ♀
C	15,13%	24,53%	21,8%	38,83%
Am	22,24%	29,13%	30,41%	38,19%
A1	0%	2,9%	25,66%	31,89%
A2	0%	6,91%	30,69%	39,02%
HA1	16,71%	15,58%	35,94%	46,3%
HA2	14,74%	16,71%	30,71%	41,38%
A+HA	0%	13,49%	30,05%	46,88%

5.3 Análise estatística

Os dados obtidos a partir da análise histomorfométrica foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a três fatores, sendo estes o tratamento realizado em cada grupo experimental (C, Am, A1, A2, HA1, HA2 e A+HA), o período de observação (sete e 21 dias) e o sexo (machos e fêmeas). Todos estes resultados estão apresentados nas Tabelas 16 a 19.

Na Tabela 16 podemos encontrar os resultados estatísticos obtidos com relação aos diferentes grupos experimentais, no período de sete dias, nos animais machos.

Tabela 16 - Estatística descritiva referente aos grupos experimentais, no período de sete dias, em machos

Grupo	Período (dias)	Sexo	Média	DP
C	7	♂	0,1514	0,0916
Am	7	♂	0,2225	0,0518
A1	7	♂	0,0	0,0
A2	7	♂	0,0	0,0
HA1	7	♂	0,1672	0,0287
HA2	7	♂	0,1475	0,0115
A+HA	7	♂	0,0	0,0

DP: desvio padrão

Na Tabela 17 podemos encontrar os resultados estatísticos obtidos com relação aos diferentes grupos experimentais, no período de sete dias, nas fêmeas.

Tabela 17 - Estatística descritiva referente aos grupos experimentais, no período de sete dias, em fêmeas

Grupo	Período (dias)	Sexo	Média	DP
C	7	♀	0,2453	0,0655
Am	7	♀	0,2914	0,078
A1	7	♀	0,03	0,0416
A2	7	♀	0,0692	0,0358
HA1	7	♀	0,1558	0,0658
HA2	7	♀	0,1672	0,0481
A+HA	7	♀	0,135	0,0311

DP: desvio padrão

Na Tabela 18 podemos encontrar os resultados estatísticos obtidos com relação aos diferentes grupos experimentais, no período de 21 dias, nos animais machos.

Tabela 18 - Estatística descritiva referente aos grupos experimentais, no período de 21 dias, em machos

Grupo	Período (dias)	Sexo	Média	DP
C	21	♂	0,2181	0,0565
Am	21	♂	0,3042	0,0924
A1	21	♂	0,2567	0,1619
A2	21	♂	0,3069	0,1475
HA1	21	♂	0,3594	0,0404
HA2	21	♂	0,3072	0,0573
A+HA	21	♂	0,3006	0,1556

DP: desvio padrão

Na Tabela 19 estão apresentados os resultados estatísticos obtidos com relação aos diferentes grupos experimentais, no período de 21 dias, nas fêmeas.

Tabela 19 - Estatística descritiva referente aos grupos experimentais, no período de 21 dias, em fêmeas

Grupo	Período (dias)	Sexo	Média	DP
C	7	♀	0,3883	0,0695
Am	7	♀	0,3819	0,0962
A1	7	♀	0,319	0,0833
A2	7	♀	0,3903	0,0798
HA1	7	♀	0,4631	0,0451
HA2	7	♀	0,4139	0,0469
A+HA	7	♀	0,4689	0,0412

DP: desvio padrão

Na Figura 11, observa-se o gráfico referente aos valores das médias e DP dos dados da neoformação óssea dos grupos C, Am, A1, A2, HA1, HA2 e A+HA, aos sete e 21 dias, nos animais machos e fêmeas.

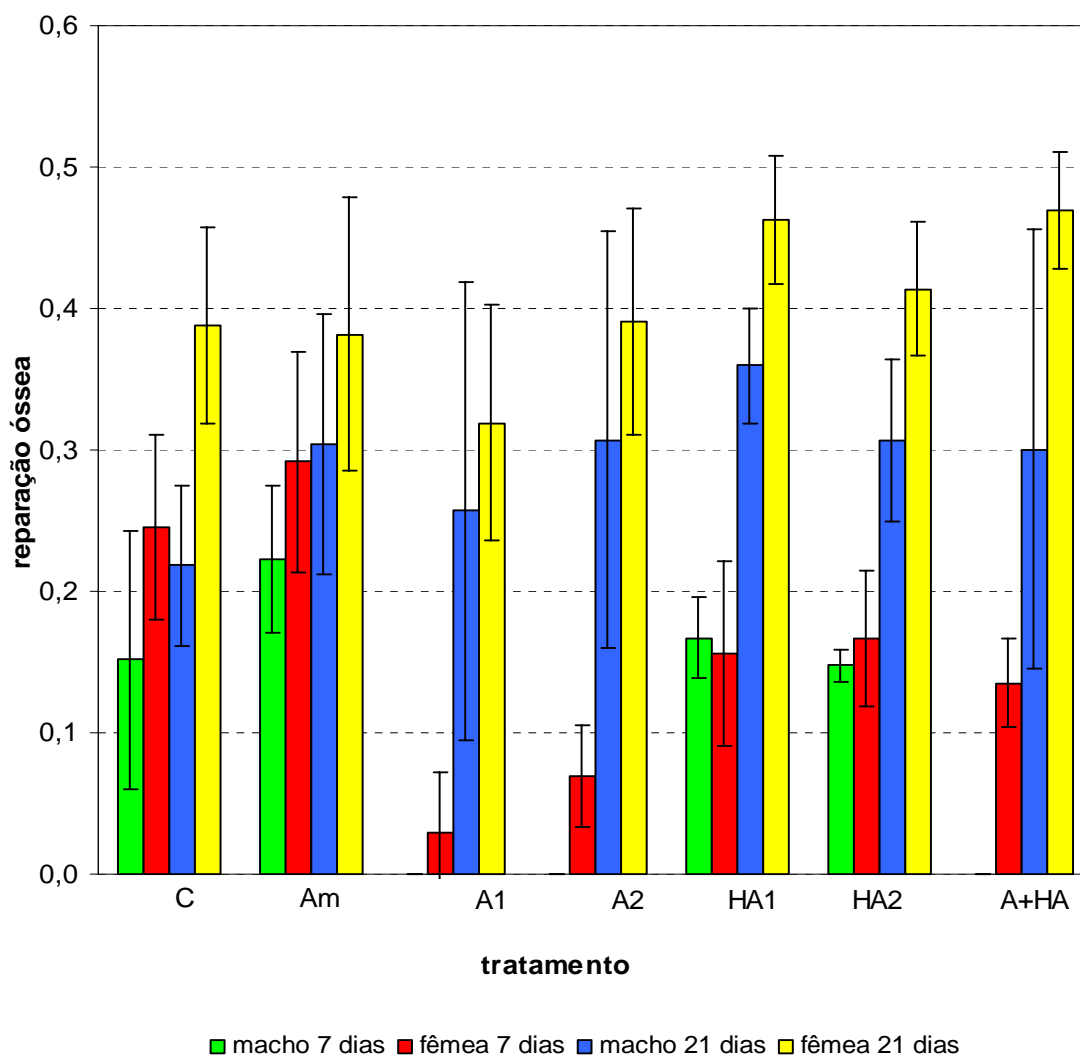


FIGURA 11 - Gráfico ilustrativo das médias e DP dos dados da neoformação óssea nos diferentes grupos experimentais, aos sete e 21 dias, nos animais machos e fêmeas.

A Figura 11 indica que houve um aumento dos valores das médias em relação aos períodos de observação, mostrando que provavelmente tenha ocorrido uma neoformação óssea progressiva, independente do tratamento realizado e do sexo dos animais. Podemos também observar que, em todos os grupo experimentais, a neoformação óssea foi mais evidente nas fêmeas quando comparado aos machos.

Na Tabela 20 estão apresentados os resultados estatísticos da ANOVA (nível de significância 1%) com relação aos fatores estudados, bem como em relação à interação entre estes fatores.

Tabela 20 - Análise de variância a três fatores

Fatores	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	Valor-P
Grupo experimental	0,3891	6	0,0649	11,7	0,0000*
Período	2,0249	1	2,0249	365,39	0,0000*
Sexo	0,293	1	0,293	52,87	0,0000*
Interação Grupo x Período	0,316	6	0,0527	9,5	0,0000*
Interação Grupo x Sexo	0,0611	6	0,0102	1,84	0,0959
Interação Período x Sexo	0,0285	1	0,0285	5,13	0,025
Interação Grupo x Período x Sexo	0,0146	6	0,0024	0,44	0,8508
Erro	0,7648	138	0,0055		
Total	3,892	165			

*P<0,01 = diferença estatisticamente significante

Considerando-se os dados descritos na Tabela 20 observamos que houve diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo experimental, ao tempo, ao sexo e na interação dos grupos experimentais e períodos de observação.

Uma vez que a análise de variância a três fatores acusou diferenças estatisticamente significantes em relação à interação do grupo experimental e o período de observação, foi realizado o teste de comparação múltipla de Tukey para comparação entre estes valores (Tabela 21).

Tabela 21 - Teste de Tukey para comparação entre os diferentes grupos experimentais e períodos de observação estudados

Grupo experimental	Período de observação	Média	Grupos homogêneos*				
A1	7	0,015	a				
A2	7	0,0346	a				
A+HA	7	0,0675	a	b			
HA2	7	0,1574	b		c		
HA1	7	0,1615	b		c		
C	7	0,1984	c		d		
Am	7	0,2569	c		d	e	
A1	21	0,2878	d		e	f	
C	21	0,3032	d		e	f	g
Am	21	0,3431	e		f	g	
A2	21	0,3486	e		f	g	
HA2	21	0,3606	e		f	g	
A+HA	21	0,3847	f		g		
HA1	21	0,4112	g				

* médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente

Como podemos observar na Tabela 21, todos os animais exibiram uma maior neoformação óssea aos 21 dias que aos sete dias, independentemente do grupo experimental, representada pelas médias mais elevadas aos 21 dias.

Aos sete dias, não houve diferenças estatísticas entre os grupos C e Am, entre A1 e A2 e, entre HA1 e HA2. O grupo A+HA também não apresentou diferenças estatísticas em relação aos grupos A1 e A2, tão pouco em relação aos grupos HA1 e HA2, diferindo apenas com relação aos grupos C e Am, que apresentaram as médias de neoformação óssea mais elevada neste período.

No período de 21 dias, diferenças estatísticas significantes foram observadas apenas entre o grupo HA1 e o grupo A1. A maior média da neoformação óssea foi apresentada pelo grupo HA1, seguida pelos grupos A+HA e HA2.

6 DISCUSSÃO

O processo de reparação óssea é complexo e tem sido amplamente estudado. Várias são as pesquisas que procuram explicar e aprimorar este mecanismo. Com este objetivo, muitos autores têm usado diferentes materiais, e experimentado substâncias farmacológicas, que possam apresentar uma atuação neste processo. Devido à sua filia pela hidroxiapatita do osso, os bisfosfonatos têm sido amplamente utilizados (COMPSTON¹⁴, 1994; SHERMAN⁷⁴, 2001).

De maneira geral, os bisfosfonatos são empregados onde ocorre um desequilíbrio do mecanismo entre a formação e a reabsorção óssea, bem como para o tratamento de muitas doenças ósseas, principalmente daquelas ligadas ao metabolismo ósseo (MARCUS⁵³, 1996; D'AOUST et al.¹⁵, 2000; KAYNAK et al.⁴¹, 2000; KULAK & BILEZIKIAN⁴⁶, 2000; BISWAS et al.⁸, 2003; SHERMAN⁷⁴, 2001; SAMBROOK⁷²; 2003; GONNELLI et al.³⁴, 2003; KAYNAK et al.⁴², 2003; SAMBROOK et al.⁷³, 2003; TORREGROSA et al.⁸², 2003; DUARTE et al.¹⁹, 2004; ROCHA et al.⁶⁸, 2004).

Autores como Fleisch²⁵ (1991), Reddy et al.⁶⁵ (1995), Marcus⁵³ (1996), Ringe et al.⁶⁷ (2001), Sherman⁷⁴ (2001), Jianhua et al.⁴⁰ (2002), Greenspan et al.³⁶ (2003) e Torregrosa et al.⁸² (2003) atribuem também aos bisfosfonatos a capacidade de provocar um relativo aumento da densidade óssea. Outros autores acreditam que estes fármacos atuem melhorando as propriedades biomecânicas dos ossos, diminuindo inclusive o risco de fraturas (GRYNPAS et al.³⁷, 1992; FLEISCH²⁶, 1997; LIBERMAN et al.⁴⁹, 1995, RINGE et al.⁶⁷, 2001, SHERMAN⁷⁴, 2001, GREENSPAN et al.³⁶, 2003; MASUD & GIANNINI⁵⁴, 2003; TORREGROSA et al.⁸², 2003).

Lin et al.⁵¹ (1991), Lin⁵⁰ (1996), Silva⁷⁵ (2000) e Alekna & Tamulaitiene¹ (2001) têm utilizado o alendronato e outros bisfosfonatos por diferentes vias de administração, sendo a via oral a mais comum delas.

Em trabalho anterior (FERNANDES et al.²³, 2004), utilizamos o alendronato por via oral, porém nossos resultados demonstraram que por esta via de administração, o alendronato não favoreceu a neoformação óssea, como também descreveu Fayad²¹ (2001). Entretanto, autores como D'Aoust et al.¹⁵ (2000) e Manolagas⁵² (2000) afirmaram que o alendronato administrado por via oral, além de promover um aumento da densidade mineral óssea, pode propiciar um aumento da neoformação óssea.

Também autores como Giuliani et al.³³ (1998), Gandolfi et al.²⁹ (1999), Reinholz et al.⁶⁶ (2000), Tenenbaum et al.⁸⁰ (2002) sugeriram a possibilidade dos bisfosfonatos atuarem na formação óssea por uma ação sobre os osteoblastos.

Todavia, a maioria dos autores descreve que o principal mecanismo de ação dos bisfosfonatos reside na sua capacidade de inibir a reabsorção óssea, por uma ação sobre os osteoclastos (YAFFE et al.⁸⁹, 1995; MARCUS⁵³, 1996; BIKLE⁶, 1998; WARNER⁸⁴, 2000; SOLOMON⁷⁷, 2002). Sendo assim, sabemos que esta ação pode ocorrer pela inibição do recrutamento dos osteoclastos, pela diminuição da aderência dessas células na matriz mineralizada, e também pela diminuição na diferenciação e no tempo de vida celular (SPARIDANS et al.⁷⁸, 1998).

Além disso, FLEISCH²⁶ (1997) descreveu que a inibição osteoclástica pode ocorrer devido à atuação medicamentosa direta sobre os osteoclastos, e que isto, provavelmente, desencadeia alterações na morfologia celular, como modificações no citoesqueleto e na borda em escova.

Considerando o que foi descrito e afirmado pelos autores acima, resolvemos utilizar o alendronato diretamente no local do defeito ósseo.

Com relação ao uso local do alendronato, Yaffe et al.⁹⁰ (1997) aplicando este fármaco sobre a superfície alveolar da mandíbula de ratos, posteriormente recobertas por um retalho mucoperiosteal, constataram que esta aplicação local provocou uma redução significativa sobre a reabsorção óssea alveolar.

Posteriormente, Yaffe et al.⁹¹ (1999) aplicaram diretamente sobre a superfície óssea uma esponja gelatinosa encharcada por alendronato, objetivando analisar sua ação no osso. Os autores concluíram que 10% do total de alendronato contido na esponja foi absorvido pelo osso localmente, embora não expliquem no trabalho como chegaram a tal percentual. Constataram como resultado, que o alendronato aplicado localmente, pode ser utilizado no tratamento preventivo da reabsorção óssea, durante procedimentos ortopédicos e odontológicos.

Na mesma linha, Binderman et al.⁷ (2000) também utilizando uma esponja gelatinosa encharcada por alendronato em diferentes concentrações, aplicada sob retalhos mucoperiosteais, constataram que as concentrações mais altas propiciaram a redução da perda óssea.

Neste estudo, diferentemente destes autores, não utilizamos o alendronato sódico para verificação da redução da perda óssea, mas sim visando à neoformação óssea.

Também contrariamente aos autores mencionados acima, não trabalhamos com dosagens de alendronato, uma vez que o nosso objetivo foi biodisponibilizar a molécula do alendronato no local do defeito ósseo. Neste trabalho, optamos por trabalhar com o alendronato em diferentes molaridades.

Usamos ainda o alendronato na forma de pó em diferentes molaridades, porque desta maneira conseguíamos assegurar, por constatação visual, que o fármaco permanecesse contido no interior do defeito ósseo, após a sua aplicação.

Em parte, optamos por trabalhar com a via de administração local do alendronato, acreditando serem verdadeiras as afirmações de autores como Kulak & Bilezikian⁴⁶ (2000) que observaram que apenas uma pequena fração do alendronato alcança a circulação sistêmica, quando administrado por via oral.

Além disso, autores como Gandolfi et al.²⁹ (1999) e Michigami et al.⁵⁷ (2002), relatam uma ação eficaz das moléculas de alendronato sobre os osteoblastos, favorecendo conseqüentemente à neoformação óssea.

Apesar das afirmações supracitadas, os resultados obtidos nessa pesquisa mostraram que a aplicação local do alendronato, na forma de concentração molar, não favoreceu o processo de neoformação óssea no local do defeito ósseo.

Em contrapartida, um achado bastante interessante em nosso trabalho foi a presença de uma neoformação óssea subperiosteal extra-cortical em todos os animais dos grupos experimentais, tanto aos sete como aos 21 dias, onde o alendronato sódico foi usado, ou seja, nos grupos alendronato um mol e dois moles, bem como no grupo alendronato mais hidroxiapatita.

Acreditamos que esta neoformação óssea possa ter sido desencadeada, pela penetração do alendronato sob o perióstio, no momento da inserção do material, no interior do defeito ósseo. Desta maneira, o alendronato pode ter agido sobre a superfície do osso, desencadeando a formação óssea.

Não encontramos, nos animais machos aos sete dias, praticamente nenhuma formação óssea no local do defeito ósseo, sendo que no referido local observávamos apenas uma rede de fibrinas.

Confirmando este achado, notamos que nos animais machos aos sete dias, foram encontradas as menores médias de neoformação óssea. Não temos como explicar esta falta de formação óssea no local do defeito, nos machos aos sete dias, pois apenas nos grupos onde o alendronato foi usado, tal característica se fazia presente.

Em relação às fêmeas aos sete dias, o alendronato em ambas as concentrações também retardou a reparação óssea, quando comparado aos grupos controle e amido.

Nos animais de ambos os sexos, aos 21 dias, verificamos as trabéculas ósseas unindo as bordas do defeito em toda a sua extensão. Além disso, estas trabéculas se direcionavam para a região mais central do canal medular, sendo que, em alguns espécimes, esse trabeculado ósseo preenchia praticamente, quase todo o canal medular.

Talvez esta formação trabecular ocorrida no canal medular, encontre respaldo no trabalho de Giuliani et al.³² (1998), que estudando a ação do alendronato em culturas de medula óssea de ratas, verificaram uma ação metabolicamente positiva deste fármaco sobre a medula óssea, podendo estimular desta maneira o processo de osteoblastogênese.

Aos 21 dias não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos alendronato um mol, dois moles e alendronato mais hidroxiapatita entre si; tampouco entre estes grupos e os grupos controle e amido.

Entretanto, apesar de não haver diferenças estatísticas entre os grupos, as maiores médias de neoformação óssea foram verificadas nos grupos alendronato dois moles e alendronato mais hidroxiapatita, indicando a possibilidade dessas substâncias favorecerem a neoformação óssea.

Os resultados encontrados neste trabalho, com relação à utilização do alendronato local em diferentes molaridades, bem como a sua biodisponibilização local, não tem como serem comparados e

discutidos, uma vez que não encontramos na literatura pesquisada nenhum trabalho que tenha utilizado metodologia semelhante.

Além de termos trabalhado isoladamente com o alendronato sódico no local do defeito ósseo, utilizamos também a hidroxiapatita nas concentrações de um e dois moles, seguindo a mesma metodologia usada para o alendronato.

Sabemos que pelo fato da hidroxiapatita ser o principal componente mineral do tecido ósseo e responsável pela solidez e rigidez do osso (WEISS & GREEP⁸⁶, 1981), ela é um dos biomateriais mais usados. Segundo Caria¹¹ (1999), a hidroxiapatita é um possível substituto para o enxerto autógeno.

Clinicamente, a hidroxiapatita vem sendo bastante empregada, e são inúmeros os trabalhos que utilizaram este material (DENISSEN & DE GROOT¹⁶, 1979; KENNEY et al.⁴³, 1985; FRAME²⁸, 1987; WOLFORD et al.⁸⁷, 1987; NAAMAN BOU-ABBOUD et al.⁵⁹, 1994; ROGERO et al.⁶⁹, 1999; SINGH et al.⁷⁶, 2004).

Dentre as características físicas pesquisadas a respeito da hidroxiapatita, destacam-se a sua forma de apresentação, bem como o tamanho, a forma das partículas e a sua porosidade (ELDEEB & ROSZKOWSKI²⁰, 1988; LEHTINEN et al.⁴⁸, 1990; GRANJEIRO et al.³⁵, 1992; ROSA et al.⁷⁰, 1995; VEECK et al.⁸³, 1995; HIGASHI & OKAMOTO³⁸, 1996, CHANG et al.¹², 2000; FLAUTRE et al.²⁴, 2001; LEGEROS⁴⁷, 2002; SPECCHIA et al.⁷⁹, 2002; GERBER et al.³¹, 2003; KIM et al.⁴⁵, 2005).

Outros autores estudaram a hidroxiapatita associada com outros materiais ou fármacos (BELL & BEIRNE⁵, 1988; ALPER et al.², 1989; COBB et al.¹³, 1990; ITO et al.³⁹, 1998; TIELIEWUHAN et al.⁸¹, 2004).

A hidroxiapatita utilizada neste trabalho apresentava partículas micro granulares, com dimensões variando entre 0,25µm a 1,0µm.

Autores como Oliveira et al.⁶⁰ (1993) e Orlovskii et al.⁶¹ (2002), chamam a atenção para a importância do estudo das características físicas da hidroxiapatita, uma vez que estas podem influenciar diretamente na resposta biológica frente à sua implantação no leito receptor.

Entretanto, Caria¹¹ (1999) e Fernandes et al.²³ (2004) observaram que a hidroxiapatita por eles utilizada apresentou as propriedades de osteocondutibilidade e biocompatibilidade. Os autores fizeram tal afirmação, pois verificaram que ocorreu crescimento ósseo ao redor dos grânulos de hidroxiapatita, sem a presença de tecido conjuntivo interposto entre o osso e as partículas de hidroxiapatita.

A hidroxiapatita utilizada neste trabalho mostrou ser reabsorvível, uma vez que, aos sete dias, encontrávamos no local do defeito ósseo grande quantidade de imagens negativas dos grânulos de hidroxiapatita; entretanto quando observávamos o local do defeito, aos 21 dias, esses grânulos não se faziam presentes. Tal característica também foi observada por nós em trabalho anterior (FERNANDES et al.²³, 2004).

Com relação à resposta inflamatória causada pela hidroxiapatita, quando esta foi usada em processos de neoformação óssea, autores como Yamamoto et al.⁹³ (1994), Argento³ (1998) e Boeck et al.⁹ (1999) afirmaram que ela causou resposta inflamatória severa e, em alguns casos, até reação do tipo corpo estranho.

Diferentemente dos autores mencionados acima, notamos em nosso trabalho que a hidroxiapatita utilizada, não desencadeou uma resposta inflamatória severa. O mesmo foi constatado por autores como Eldeeb & Roszkowski²⁰ (1988), Caria¹¹ (1999), Orlovskii et al.⁶¹ (2002), e Fernandes et al.²³ (2004).

Apesar de termos comparado os nossos resultados com os obtidos por estes autores, é importante chamar a atenção para o fato de cada um deles ter usado uma hidroxiapatita com características físicas

diferentes, fato este que deve ser levado em conta, quando se comparam os trabalhos entre si.

Finalmente, com relação à resposta inflamatória encontrada com o uso da hidroxiapatita em diferentes molaridades, constatamos que esta ocorreu independentemente do sexo do animal e do período estudado.

Uma vez que constatamos pouca reação inflamatória com a hidroxiapatita utilizada, somos levados a afirmar que, provavelmente, esta hidroxiapatita seja biocompatível. A nossa observação está de acordo com os achados de autores como Cobb et al.¹³ (1990), Veeck et al.⁸³ (1995), Ruano et al.⁷¹ (1996), Caria¹¹ (1999), Legeros⁴⁷ (2002) e Fernandes et al.²³, (2004).

Baseada nos dados histomorfométricos, a análise estatística mostrou que, aos sete dias de observação, os grupos hidroxiapatita um mol e dois moles não diferiram entre si, em ambos os sexos estudados.

Também não houve diferença estatisticamente significativa, quando comparamos o grupo hidroxiapatita um mol e dois moles, com os grupos controle e amido, independentemente do sexo dos animais.

Sendo assim, afirmamos que, aos sete dias de observação, a presença da hidroxiapatita no defeito não interferiu no processo de reparação óssea.

Nossos resultados coincidem com os de Bell & Beirne⁵ (1988), que observaram que a hidroxiapatita não favoreceu, nem tampouco prejudicou neoformação óssea. Por outro lado, diferem dos resultados obtidos por Alper et al.² (1989), Rosa et al.⁷⁰ (1995), Argento³ (1998) e Boeck et al.⁹ (1999), que relataram que a hidroxiapatita interferiu negativamente, retardando a neoformação óssea.

É importante frisar que, embora seja possível a comparação dos resultados entre si, a utilização da hidroxiapatita nas concentrações de um e dois moles não é descrita por nenhum outro trabalho na literatura; por nós pesquisados.

Analisando qualitativamente nossos resultados, observamos que, aos sete dias, comparando-se as médias de neoformação óssea dos grupos hidroxiapatita um mol e dois moles, com os valores das médias dos demais grupos, notamos que as maiores médias de neoformação óssea ocorreram nos grupos controle e amido.

Com relação ao sexo, ainda aos sete dias, vemos que as médias obtidas pelos grupos hidroxiapatita um mol e hidroxiapatita dois moles foram semelhantes entre os machos e as fêmeas.

Já aos 21 dias, estatisticamente houve diferença apenas entre o grupo hidroxiapatita um mol e o grupo alendronato um mol.

Entretanto, comparando-se as médias da neoformação óssea de todos os grupos, constatamos que os maiores valores foram encontrados nos grupos hidroxiapatita um mol, dois moles e alendronato mais hidroxiapatita.

Quando comparamos os resultados obtidos com o uso da hidroxiapatita nos diferentes períodos, vemos que os resultados aos 21 dias foram melhores. Acreditamos que tal fato se deva, em decorrência do período de sete dias ser insuficiente para a ação da propriedade osteocondutora da hidroxiapatita.

Analisando o sexo dos animais, aos 21 dias notamos que a neoformação óssea foi mais evidente nas fêmeas que nos machos.

A utilização concomitante do alendronato mais a hidroxiapatita é ainda pouco pesquisada. Isto se deve, provavelmente, à dificuldade de se estabelecer uma metodologia adequada para a associação destas duas substâncias.

Os trabalhos encontrados na literatura científica, além de serem extremamente escassos, não descrevem de forma clara e pormenorizada como foi feita a associação entre o alendronato e a hidroxiapatita.

Nossos resultados mostraram que a neoformação óssea observada, quando da ação concomitante do alendronato com a hidroxiapatita, foi mais evidente nas fêmeas que nos machos, tanto aos sete, quanto aos 21 dias.

Estatisticamente, não foram verificadas diferenças entre o grupo alendronato mais hidroxiapatita e os grupos controle e amido, aos 21 dias.

Aos sete dias foram encontradas diferenças estatísticas, apenas entre o grupo alendronato mais hidroxiapatita e o grupo amido; aos 21 dias, entre o grupo alendronato mais hidroxiapatita e o grupo alendronato um mol.

Concluimos que a utilização do alendronato mais a hidroxiapatita, aplicado no defeito, não intensificou o processo de reparação óssea.

Este resultado foi semelhante ao de Fernandes et al.²³ (2004) que, utilizando alendronato via oral e hidroxiapatita localmente, no reparo de defeito ósseos em mandíbula de coelhos, não encontraram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle.

Contudo, nossos resultados, mesmo usando uma metodologia diferente, são contrários aos obtidos por Meraw & Reeve⁵⁵ (1999), Meraw et al.⁵⁶ (1999), Denissen et al.¹⁷⁻⁸ (2000) que, trabalhando com blocos de hidroxiapatita revestidos por alendronato, implantados em diferentes animais, afirmaram que esta associação potencializou a formação óssea ao redor dos implantes.

Já, Yoshinari et al.⁹⁴ (2001) não mostrando claramente seus resultados, afirmaram que a combinação hidroxiapatita e bisfosfonato, aplicado sobre o titânio pode ser útil, em implantes dentários.

Finalmente, Ganguli et al.³⁰ (2002), trabalhando *in vitro*, verificaram que a hidroxiapatita associada a outros bisfosfonatos, aumentou a síntese de DNA e de colágeno pelos osteoblastos, favorecendo, desta maneira, à osteointegração.

Apesar de não termos verificado diferenças estatísticas entre os diferentes grupos de materiais utilizados, ainda acreditamos que com algumas variações e pequenos aprimoramentos na metodologia, iremos, num futuro próximo, obter resultados mais expressivos, com relação ao uso do alendronato aplicado localmente, bem como a sua associação com outras substâncias, como a hidroxiapatita.

7 CONCLUSÃO

Baseados nos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

- a) a aplicação local do alendronato sódico interferiu negativamente na reparação óssea no modelo experimental proposto;
- b) a aplicação local da hidroxiapatita e do alendronato mais a hidroxiapatita não interferiram na reparação óssea;
- c) a reparação óssea foi mais evidente nas fêmeas, independentemente do período e do grupo estudados.

8 REFERÊNCIAS*

- 1 ALEKNA, V.; TAMULAITIENE, M. Sodium alendronate: once per day or per week? **Gerontol**, v.2, n.2, p. 124-6, 2001. (Abstract). Disponível em: <<http://www.gerontologia.lt/em/2001nr2/7.htm>>. Acesso em: 06 nov. 2002.
- 2 ALPER, G. et al. Osteogenesis in bone defects in rats: the effects of hydroxyapatite and desmineralized bone matrix. **Am J Med Sci**, v.298, n.6, p.371-6, Dec. 1989.
- 3 ARGENTO, M.A. **Análise histológica da reparação de defeitos ósseos criados em fêmures de ratos preenchidos com hidroxiapatita**. 1998. 67f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Área de Concentração em Periodontia) - Faculdade de Odontologia - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- 4 BARBARA, A.; HARARI, N.D.; GROISMAN, M. Implantes com coberturas de hidroxiapatita: uma revisão. **Rev Bras Implant**, v.1, p.5-12, jan./fev. 1997.
- 5 BELL, R.; BEIRNE, O.R. Effect of hydroxylapatite, tricalcium phosphate, and collagen on the healing of defects in the rat mandible. **J Oral Maxillofac Surg**, v.46, n.7, p.589-94, July 1988.

*Baseado em:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Informação e documentação: referências, elaboração**, NBr 6023. Rio de Janeiro, 2002. 23p.

- 6 BIKLE, D.D. Agentes que afetam a homeostasia do mineral ósseo. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. Trad. F.D. Mundim. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1998. Cap.41, p. 498-590.
- 7 BINDERMAN, I.; ADUT, M.; YAFFE, A. Effectiveness of local delivery of alendronate in reduce bone loss following periodontal surgery in rats. **J Periodontol**, v.71, n.8, p.1236-40, Aug. 2000.
- 8 BISWAS, P.N. et al. Pharmacovigilance study of alendronate in England. **Osteoporos Int**, v.14, n.6, p.507-14, Jun. 2003.
- 9 BOECK, E.M. et al. Implante de hidroxiapatita em alvéolos dentais. Estudo histopatológico em rato. **Rev Odontol UNESP**, v.28, n.1, p.83-96, jan./jun. 1999.
- 10 BRUNSVOLD, M. A. et al. Effects of a bisphosphonate on experimental periodontitis in monkeys. **J Periodontol**, v.63, n.10, p.825-30, Oct. 1992.
- 11 CARIA, P.H.F. **Enxerto periosteal e hidroxiapatita no tratamento da falha óssea produzida na pré-maxila de ratos**. 1999. 82f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural, Área de Concentração em Anatomia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, 1999.
- 12 CHANG, B.S. et al. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. **Biomaterials**, v.21, n.12, p.1291-8, June 2000.

- 13 COBB, C.M. et al. Restoration of mandibular continuity defects using combinations of hydroxylapatite and autogenous bone: microscopic observations. **J Oral Maxillofac Surg**, v.48, n.3, p.268-75, Mar. 1990.
- 14 COMPSTON, J.E. The therapeutic use of bisphosphonates. **BMJ**, v.309, n.6956, p.711-5, Sept. 1994.
- 15 D'AOUST, P. et al. Etidronate (HEBP) promotes osteoblast differentiation and wound closure in rat calvaria. **Cell Tissue Res**, v.302, n.3, p.353-63, Dec. 2000.
- 16 DENISSEN, H.W.; De GROOT, K. Immediate dental root implants from synthetic dense calcium hydroxyapatite. **J Prosthet Dent**, v.42, n.5, p.551-6, Nov. 1979.
- 17 DENISSEN, H. et al. Alveolar bone response to submerged bisphosphonate-complexed hydroxyapatite implants. **J Periodontol**, v.71, n.2, p.279-86, Feb. 2000.
- 18 DENISSEN, H. et al. Normal osteoconduction and repair in and around submerged highly bisphosphonate-complexed hydroxyapatite implants in rat tibiae. **J Periodontol**, v.71, n.2, p.272-8, Feb. 2000.
- 19 DUARTE, P.M. et al. Alendronate may protect against increased periodontitis-related bone loss in estrogen-deficient rats. **J Periodontol**, v.75, n.9, p.1196-202, Sept. 2004.
- 20 ELDEEB, M.; ROSZKOWSKI, M. Hydroxylapatite granules and blocks as an extracranial augmenting material in Rhesus monkeys. **J Oral Maxillofac Surg**, v.46, n.1, p.33-40, Jan. 1988.

- 21 FAYAD, M.V.L. **Reparação óssea sob ação de duas formulações de bisfosfonatos**: estudo comparativo radiográfico e histológico. 2001. 102f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2001.
- 22 FERNANDES, R.G. **Estudo da reparação óssea na mandíbula de coelhos sob a ação do alendronato sódico e da sua associação com a hidroxiapatita**. 2002. 112f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2002.
- 23 FERNANDES, R.G.; FAIG-LEITE, H.; CARVALHO, Y.R. Estudo da reparação óssea na mandíbula de coelhos sob a ação do alendronato sódico e da sua associação com a hidroxiapatita. **Rev Odontol UNESP**, v.33, n.3, p.123-30, 2004.
- 24 FLAUTRE, B. et al. Porous HA ceramic for bone replacement: role of the pores and interconnections: experimental study in the rabbit. **J Mater Sci Mater Med**, v. 12, n.8, p.679-82, 2001.
- 25 FLEISCH, H. Bisphosphonates. Pharmacology and use in the treatment of tumour-induced hypercalcaemic and metastatic bone disease. **Drugs**, v.42, n.6, p.919-44, Dec. 1991.
- 26 FLEISCH, H.A. Bisphosphonates: preclinical aspects and use in osteoporosis. **Ann Med**, v.29, n.1, p.55-62, Feb. 1997.

- 27 FOGELMAN, I. et al. Residronate reverses bone loss in postmenopausal women with low bone mass: results from a multinational, double-blind, placebo-controlled trial. **Obstet Gynecol Surv**, v.55, n.10, p.630-2, Oct. 2000. Disponível em: <<http://gateway1.ovid.com/ovidmed.cgi>>. Acesso em: 14 mar. 2002.
- 28 FRAME, J.W. Hydroxyapatite as a biomaterial for alveolar ridge augmentation. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.16, n.6, p.642-55, Dec. 1987.
- 29 GANDOLFI, M.G. et al. Osteoblast behavior in the presence of bisphosphonates: ultrastructural and biochemical in vitro studies. **Clin Exp Rheumatol**, v.17, n.3, p.327-33, May/June 1999.
- 30 GANGULI, A. et al. The interactions of bisphosphonates in solution and as coatings on hydroxyapatite with osteoblasts. **J Mater Sci Mater Med**, v.13, n.10, p.923-31, Oct. 2002.
- 31 GERBER, T.H. et al. Development and in vitro test of sol-gel derived bone grafting materials. **J Sol-Gel Sci Technol**, v.26, p.1173-8, 2003.
- 32 GIULIANI, N. et al. 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**, v.22, n.5, p.455-61, May 1998.

- 33 GIULIANI, N. et al. Bisphosphonates stimulate the production of basic fibroblast growth factor and the formation of bone marrow precursors of osteoblasts. New findings about their mechanism of action. **Minerva Med**, v.89, n.7-8, p.249-58, July/Aug. 1998. (Abstract).
- 34 GONNELLI, S. et al. Alendronate treatment in men with primary osteoporosis: a three-year longitudinal study. **Calcif Tissue Int**, v.73, n.2, p.133-9, Aug. 2003.
- 35 GRANJEIRO, J.M. et al. Hidroxiapatita para uso clínico: caracterização físico-química. **Rev Gaucha Odontol**, v.40, n.2, p.130-4, mar./abr. 1992.
- 36 GREENSPAN, S.L. et al. Combination therapy with hormone replacement and alendronate for prevention of bone loss in elderly women: a randomized controlled trial. **J Am Med Assoc**, v.289, n.19, p.2525-33, May 2003.
- 37 GRYNPAS, M.D. et al. Changes in bone mineralization, architecture and mechanical properties due to long-term (1 year) administration of pamidronate to adult dogs. **Osteoporos Int**, v.2, n.2, p.74-81, Mar. 1992. (Abstract)
- 38 HIGASHI, T.; OKAMOTO, H. Influence of particle size of hydroxyapatite as a capping agent on cell proliferation of cultured fibroblasts. **J Endod**, v.22, n.5, p.236-9, May 1996.

- 39 ITO, K. et al. Comparison of osseointegration between hydroxyapatite-coated and uncoated threaded titanium dental implants placed into surgically-created bone defect in rabbit tibia. **J Oral Sci**, v.40, n.1, p.37-41, Mar. 1998.
- 40 JIANHUA, H. et al. Effects of alendronate on structural properties of trabecular bone in dogs. **Chin Med Sci J**, v.17, n.4, p.210-4, Dec. 2002.
- 41 KAYNAK, D. et al. A histopathological investigation on the bisphosphonate alendronate on resorptive phase following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. **J Periodontol**, v.71, n.5, p.790-6, May 2000.
- 42 KAYNAK, D. et al. A histopathological investigation on the effect of systemic administration of the bisphosphonate alendronate on resorptive phase following mucoperiosteal flap surgery in the rat mandible. **J Periodontol**, v.74, n.9, p.1348-54, Sept. 2003.
- 43 KENNEY, E.B. et al. The use of porous hydroxyapatite implant in periodontal defects. **J Periodontol**, v.56, n.2, p.82-8, Feb. 1985.
- 44 KENT, J.N. et al. Correction of alveolar ridge deficiencies with nonresorbable hydroxylapatite. **J Am Dent Assoc**, v.105, n.6, p.993-1001, Dec. 1982.
- 45 KIM, H.W.; KNOWLES, J.C.; KIM, H.E. Hydroxyapatite porous scaffold engineered with biological polymer hybrid coating for antibiotic Vancomycin release. **J Mater Sci Mater Med**, v.16, n.3, p.189-95, Mar. 2005.

- 46 KULAK, C.; BILEZIKIAN, J. Bisfosfonatos: características e utilização na osteropose. In: BANDEIRA, F. et al. **Osteoporose**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. Cap.22, p.351-72.
- 47 LEGEROS, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clin Orthop Relat Res**, v.1, n.395, p.81-98, Feb. 2002.
- 48 LEHTINEN, R.; KUUSILEHTO, A.; NIKKANEN, U.M. Bone response to hydroxyapatite particles of different shapes in rabbit tibia. **J Oral Maxillofac Surg**, v.48, n.10, p.1075-8, Oct. 1990.
- 49 LIBERMAN, U.A. et al. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. **New Engl J Med**, v.333, n.22, p.1434-43, Nov. 1995. Disponível em: <<http://gateway1.ovid.com/ovidmed.cgi>> Acesso em: 14 mar. 2002.
- 50 LIN, J.H. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. **Bone**, v.18, n.2, p.75-85, Feb. 1996.
- 51 LIN, J.H. et al. Physiological disposition of alendronate, a potent anti-osteolytic bisphosphonate in laboratory animals. **Drug Metab Dispos**, v.19, n.5, p.926-32, Sept./Oct. 1991.
- 52 MANOLAGAS, S.C. Birth and death of bone cells: basis regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endocr Rev**, v.21, n.2, p.115-37, Apr. 2000.

- 53 MARCUS, R. Fármacos que afetam a calcificação e a renovação do osso. In: GILMAN, A.G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Trad. J.G. Hardman. 9 ed. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill-Interamericana, 1996. Cap.61, p.1139-40.
- 54 MASUD, T.; GIANNINI, S. Preventing osteoporotic fractures with bisphosphonates: a review of the efficacy and tolerability. **Aging Clin Exp Res**, v.15, n.2, p.80-98, Apr. 2003.
- 55 MERAW, S.J.; REEVE, C.M. Qualitative analysis of peripheral peri-implant bone and influence of alendronate sodium on early bone regeneration. **J Periodontol**, v.70, n.10, p.1228-33, Oct. 1999.
- 56 MERAW, S.J.; REEVE, C.M.; WOLLAN, P.C. Use of alendronate in peri-implant defect regeneration. **J Periodontol**, v.70, n.2, p.151-8, Feb. 1999.
- 57 MICHIGAMI, T. et al. The effect of bisphosphonate ibandronate on breast cancer metastasis to visceral organs. **Breast Cancer Res Treat**, v.75, n.3, p.249-58, Oct. 2002.
- 58 MISCH, C.E.; DIETSH, F. Bone-grafting materials in implant dentistry. **Implant Dent**, v.2, n.3, p.158-67, Fall 1993.
- 59 NAAMAN BOU-ABBOUD, N. et al. Evaluation of the osteogenic potential of biomaterials implanted in the palatal connective tissue of miniature pigs using undercalcified sections. **Biomaterials**, v.15, n.3, p.201-7, Feb. 1994.

- 60 OLIVEIRA, D.T. et al. Hidroxiapatita microgranular: comportamento biológico em tecido subcutâneo de ratos. **Rev Odontol UNESP**, v.22, n.2, p.197-202, jul./dez. 1993.
- 61 ORLOVSKII, V. P.; KOMLEV, V. S.; BARINOV, S. M. Hydroxyapatite and hydroxyapatite-based ceramics. **Inorganic Mater**, v. 38, n.10, p.1159-72, Apr. 2002.
- 62 OWENS, J.M.; FULLER, K.; CHAMBERS, T.J. Osteoclast activation: potent inhibition by the bisphosphonate alendronate through a nonresorptive mechanism. **J Cell Physiol**, v.172, n.1, p.79-86, July 1997.
- 63 RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Metabolismo ósseo. In:_. **Farmacologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001. Cap.27, p.377-84.
- 64 RANSFORD, A.O. et al. Synthetic porous ceramic compared with autograft in scoliosis surgery: a prospective, randomized study of 341 patients. **J Bone Joint Surg Br**, v.80, n.1, p.13-8, Jan. 1998.
- 65 REDDY, M.S. et al. Alendronate treatment of naturally-occurring periodontitis in beagle dogs. **J Periodontol**, v.66, n.3, p.211-7, Mar. 1995.
- 66 REINHOLZ, G.G. et al. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. **Cancer Res**, v.60, n.21, p.6001-7, Nov. 2000.

- 67 RINGE, J.D.; FABER, H.; DORST, A. Alendronate treatment of established primary osteoporosis in men: results of a 2-year prospective study. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, n.11, p.5252-5, Nov. 2001.
- 68 ROCHA, M.L. et al. Effect of alendronate on periodontal disease in postmenopausal women: a randomized placebo-controlled trial. **J Periodontol**, v.75, n.12, p.1579-85, Dec. 2004.
- 69 ROGERO, S.O.; BRAGA, F.J.C.; HIGA, O.Z. Cytotoxicity test for bioceramics of calcium phosphate. **Mater Sci**, v.299-300, p.44-7, Nov. 1999.
- 70 ROSA, A.L.; BRENTGANI, L.G.; GRANDINI, S.A. Hydroxylapatite and tricalcium phosphate implants in the dental alveolous of rats. A histometric study. **Braz Dent J**, v.6, n.2, p.103-9. 1995.
- 71 RUANO, R.; JORGE, A.G.; JAEGER, M.M.M. Estudo *in vitro* da biocompatibilidade da hidroxiapatita utilizada em implantodontia. **Rev Pós-Grad**, v.3, n.2, p.135-41, abr./jun. 1996.
- 72 SAMBROOK, P. Once weekly alendronate. **Drugs Today (Barc)**, v.39, n.5, p.339-46, May 2003.
- 73 SAMBROOK, P.N. et al. Prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis: a comparison of calcitriol, vitamin D plus calcium, and alendronate plus calcium. **J Bone Miner Res**, v.18, n.5, p.919-24, May 2003.

- 74 SHERMAN, S. Preventing and treating osteoporosis: strategies at the millennium. **Ann N Y Acad Sci**, v.949, p.188-97, Dec. 2001. Disponível em: <<http://gateway1.ovid.com/ovidmed.cgi>>. Acesso em: 14 mar. 2002.
- 75 SILVA, C.M.O.M. **Avaliação do alendronato sódico sobre a reparação óssea na ausência dos hormônios ovarianos**. 2000. 102f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Área de Concentração- Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2000.
- 76 SINGH, S.; TRIKHA, S.P.; EDGE, A.J. Hydroxyapatite ceramic-coated femoral stems in young patients. **J Bone Joint Surg Br**, v.86, n.8, p.1118-23, Nov. 2004.
- 77 SOLOMON, C.G. Bisphosphonates and osteoporosis. **N Engl J Med**, v.346, n.9, p.642, Feb. 2002. Disponível em: <<http://gateway1.ovid.com/ovidmed.cgi>>. Acesso em: 23 abr. 2002.
- 78 SPARIDANS, R.W.; TWISS, I.M.; TALBOT, S. Bisphosphonates in bone diseases. **Pharm World Sci**, v.20, n.5, p.206-13, Oct. 1998.
- 79 SPECCHIA, N. et al. Effect of hydroxyapatite porosity on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. **J Mater Sci**, v.37, n.3, p.577-84, 2002.
- 80 TENENBAUM, H.C. et al. Bisphosphonates and periodontics: potential applications for regulation of bone mass in the periodontium and other therapeutic/diagnostic uses. **J Periodontol**, v.73, n.7, p.813-22, July 2002.

- 81 TIELIEWUHAN, Y. et al. Osteoblast proliferation behavior and bone formation on and in CO₃apatite-collagen sponges with a porous hydroxyapatite frame. **J Mater Sci**, v.23, n.3, p.258-64, Sept. 2004.
- 82 TORREGROSA, J.V. et al. Alendronate for treatment of renal transplant patients with osteoporosis. **Transplant Proc**, v.35, n.4, p.1393-5, June 2003.
- 83 VEECK, E.B.; PURICELLI, E.; SOUZA, M.A.L. Análise do comportamento do osso e medula hemopoética em relação a implantes de titânio e hidroxiapatita: estudo experimental em fêmur de rato. **Rev Odonto Cienc**, v.10, n.19, p.235-91, jun. 1995.
- 84 WARNER, W. Hormônios da hemostasia. In: YAGIELA, J.A.; NEIDLE, E.A.; DOWN, F.J. **Farmacologia e terapêutica para dentistas**. Trad. P. Silva. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. Cap.34, p. 434-54.
- 85 WEINREB, M. et al. Histomorphometrical analysis of the effects of the bisphosphonate alendronate on bone loss caused by experimental periodontitis in monkeys. **J Periodontol**, v.29, n.1, p.35-40, Jan. 1994.
- 86 WEISS, L.; GREEP, R.O. Os tecidos esqueléticos. In: **Histologia**. Trad. B.A. Lobo. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1981. Cap. 6, p.180-99.
- 87 WOLFORD, L.M.; WARDROP, R.W.; HAETOG, J.M. Coralline porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in orthognathic surgery. **J Oral Maxillofac Surg**, v.45, n.12, p.1034-42, Dec. 1987.

- 88 XIE, J.; BAUMANN, M.J.; McCABE, L.R. Osteoblasts respond to hydroxyapatite surfaces with immediate changes in gene expression. **J Biomed Mater Res**, v.71-A, n.1, p.108-17, Oct. 2004.
- 89 YAFFE, A. et al. The effect of bisphosphonate on alveolar bone resorption following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. **J Periodontol**, v.66, n.11, p.999-1003, Nov. 1995.
- 90 YAFFE, A. et al. Local delivery of an amino bisphosphonate prevents the resorptive phase of alveolar bone following mucoperiosteal flap surgery in rats. **J Periodontol**, v.68, n.9, p.884-9, Sept. 1997.
- 91 YAFFE, A. et al. Disposition of alendronate following local delivery in a rat jaw. **J Periodontol**, v.70, n.8, p.893-5, Aug. 1999.
- 92 YAFFE, A. et al. The effect of topical delivery of novel bisacylphosphonates in reducing alveolar bone loss in the rat model. **J Periodontol**, v.71, n.10, p.1607-12, Oct. 2000.
- 93 YAMAMOTO, M.K.; LUZ, J.G.C.; ARAÚJO, V.C. Resposta tecidual óssea frente à hidroxiapatita granular implantada em defeitos criados na mandíbula de ratos. **Rev Odontol Univ São Paulo**, v.8, n.4, p.281-6, out./dez. 1994.
- 94 YOSHINARI, M. et al. Immobilization of bisphosphonates on surface modified titanium. **Biomaterials**, v.22, n.7, p.709-15, Apr. 2001.

FERNANDES, R.G. **Study of the local action of sodium alendronate, of hydroxyapatite and of the association sodium alendronate with hydroxyapatite, in bone repair of femurs of mices.** 2005. 127f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2005.

ABSTRACT

This research evaluated the effect of the local use of sodium alendronate, of hydroxyapatite and the association alendronate more hydroxyapatite in different molar concentrations, in the repair of bone defects in femurs of mices. We made in the femur of 168 mices (84 males and 84 females) a bone defect measuring 2,5mm of diameter. We divided these animals in groups: control, starch, alendronate one mol, alendronate two mols, hydroxyapatite one mol, hydroxyapatite two mols and alendronate more hydroxyapatite, in accordance with the material of fulfilment used. In the animals of the control group, the defect was just filled by the clot originating from defect. The animals were sacrificed at seven and 21 days, when the femur was removed, fixed and decalcified, to making histologics laminae. Histological and histomorphometric analyses were performed and the results obtained were submitted to statistical analysis ANOVA. At seven days, it was observed immature bone trabeculae with larges osteocytes. It was noticed bone formation in all groups, exceptin the male animals where the alendronate was present. In the group that received hydroxyapatite, it was visualized negatives images of the hydroxyapatite's granules. At 21 days, the trabeculae practically closed the defect of most studied specimens. Statistically, there were differences between males and females, between the observation periods and with relationship of the alendronate use. It was concluded that the local application of sodium alendronate interfered negatively in bone repair, that the hydroxyapatite and alendronate more hydroxyapatite didn't interfere in the repair and that the bone repair was larger in the females independently of studied period.

KEYWORDS: *Bone regeneration; bone; repair; bisphosphonates; alendronate; hydroxyapatite; animal.*

Anexo - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP