

ANTONIO CARLOS VICTOR CANETTIERI

**REPARAÇÃO ÓSSEA EM FÊMURES DE RATAS
OVARIECTOMIZADAS SOB A AÇÃO LOCAL DO ALENDRONATO
SÓDICO, DA HIDROXIAPATITA E DA ASSOCIAÇÃO ALENDRONATO
COM A HIDROXIAPATITA**

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.

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.

CANETTIERI, A.C.V. **Reparação óssea em fêmures de ratas ovariectomizadas sob a ação local do alendronato sódico, da hidroxiapatita e da associação alendronato com a hidroxiapatita.** 2006. 144f. Tese (Doutorado em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2006.

ANTONIO CARLOS VICTOR CANETTIERI

**REPARAÇÃO ÓSSEA EM FÊMURES DE RATAS
OVARIECTOMIZADAS SOB A AÇÃO LOCAL DO ALENDRONATO
SÓDICO, DA HIDROXIAPATITA E DA ASSOCIAÇÃO ALENDRONATO
COM A HIDROXIAPATITA**

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. Titular Horácio Faig Leite

São José dos Campos
2006

**Dedico esse trabalho à
minha esposa Erica Regina Condino Fugarra, agradecendo-a pelo
carinho, paciência e presença constante em cada etapa dessa
caminhada.**

Ao teu lado, tudo pareceu mais simples.

**E à minha mãe Geny Victor Canettieri, agindo a distância, com
palavras confortadoras e intensas, e
não se esquecendo, pela eterna companhia e saudades, da memória
de meu pai Hélio Fábio Canettieri.**

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Professor Titular Horácio Faig Leite pela sua orientação precisa, formando-me e informando-me, com generosa dedicação e liberdade, essenciais para o perfeito andamento dessa pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, representada pelo Diretor Prof. Adjunto Paulo Villela Santos Junior.

Ao Curso de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, representado pela Coordenadora Profa. Adjunta Rosilene Fernandes da Rocha

À Profa. Adjunta Yasmin Rodarte Carvalho, pela disposição em esclarecer as minhas dúvidas, pela compreensão e ajuda na solução de empecilhos durante essa pesquisa.

Ao Prof. Adj. Luis Eduardo Blumer Rosa, pela disponibilidade, pela gentileza e pelo auxílio de sempre.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Dias Colombo, amigo desde da época da Graduação e Mestrado, pela paciência e disposição na ativa participação na atividade experimental desse trabalho. Apenas amigos de verdade podem e sabem dedicar dias, horas no auxílio generoso a um colega.

À Profa. Dra. Chung Man Chin do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, pela enorme colaboração no desenvolvimento da metodologia desse trabalho.

À Profa. Dra. Carmelinda Schmidt Unterkircher, minha orientadora de Mestrado, que me conduziu no caminho da pesquisa e se encontra sempre em minhas recordações.

À todos os Professores de nosso departamento – Profas. Janete Dias Almeida, Ana Sueli Rodrigues Cavalcante, Adriana Aigotti Haberbeck Brandão, Mônica Fernandes Gomes; Profs. Antonio Olavo Cardoso Jorge e Luiz Antonio Guimarães Cabral, pela dedicação ao ensino e à pesquisa.

Ao Prof. Camilo Daleles Rennó pelo precioso auxílio na análise estatística e pela paciência na explicação de todo processo.

À bibliotecária Ângela de Brito Bellini pela paciência e valiosas orientações na correção da estrutura desse trabalho científico.

À Profa. Dra. Raquel Guedes Fernandes, colega de pesquisa, pelas orientações, pela amizade, pela disposição em me auxiliar na resolução de dúvidas.

À colega de laboratório Mônica Dal Pian Nobre, pela convivência agradável e construtiva, pelo empenho em solucionar questões comuns, como brocas, descalcificação das peças...

Ao funcionário Paulo Rogério Martins, da Disciplina de Anatomia, pela colaboração e paciência.

À funcionária Ana Lourdes da Silva Machado, da Disciplina de Patologia, pela confecção das lâminas, agindo sempre com muito cuidado e precisão, permitindo o sucesso nessa etapa da pesquisa.

Aos funcionários do Biotério, Lourival Jacob e Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos, pelos ensinamentos indispensáveis com o trato dos animais, pela disposição em todos os momentos em que precisei de auxílio, além da amizade decorrente do nosso convívio.

E a todos aqueles que me ajudaram de alguma maneira para que tudo chegasse ao fim e desse certo!!!

Segue o teu destino

Rega as tuas plantas

Ama as tuas rosas

O resto é sombra

De árvores alheias

Vê de longe a vida

Nunca interrogues

A resposta está além

dos deuses

A realidade

Sei que é mais ou menos

Do que nos queremos

Só nós somos sempre

Iguais a nós próprios

Mas serenamente

Imita o Olímpo

No seu coração

Os deuses são deuses

Porque não se pensam

Não se pensam

Suave é viver só

Grande e nobre é sempre

Viver simplesmente

Deixa a dor nas aras

Como ex- votos aos deuses

(Ricardo Reis –

Fernando Pessoa)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	14
RESUMO.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Osteoporose pós-menopausa.....	19
2.2 Os osteoclastos.....	23
2.3 Bisfosfonatos.....	27
2.3.1 Mecanismos de ação dos bisfosfonatos.....	30
2.3.2 Alendronato sódico.....	32
2.4 Hidroxiapatita.....	50
3 PROPOSIÇÃO.....	67
4 MATERIAL E MÉTODO.....	68
4.1 Animais.....	68
4.2 Divisão dos grupos.....	68
4.3 Materiais utilizados.....	71
4.4 Procedimentos cirúrgicos.....	73
4.4.1 Ovariectomia.....	74
4.4.2 Defeito ósseo.....	74
4.5 Sacrifício.....	77
4.6 Análise dos resultados.....	77
4.6.1 Análise histológica.....	78

4.6.2 Análise histomorfométrica.....	78
4.7 Análise estatística.....	79
5 RESULTADOS.....	80
5.1 Análise histológica – sete dias.....	80
5.1.1 Grupo controle (C).....	80
5.1.2 Grupo amido (Am).....	82
5.1.3 Grupos alendronato (A1 e A2).....	82
5.1.4 Grupos hidroxiapatita (HA1 e HA2).....	84
5.1.5 Grupo associação alendronato e hidroxiapatita.....	85
5.2 Análise histológica – 21 dias.....	85
5.2.1 Grupo controle (C).....	85
5.2.2 Grupo amido (Am).....	87
5.2.3 Grupos alendronato (A1 e A2).....	87
5.2.4 Grupos hidroxiapatita (HA1 e HA2).....	89
5.2.5 Grupo associação alendronato e hidroxiapatita.....	91
5.3 Análise histomorfométrica.....	92
5.4 Análise estatística.....	96
6 DISCUSSÃO.....	102
7 CONCLUSÃO.....	121
8 REFERENCIAS.....	122
ANEXOS.....	143
<i>ABSTRACT</i>	144

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Procedimentos cirúrgicos para a realização da ovariectomia e para confecção do defeito cirúrgico no fêmur esquerdo: a) região na qual foi feita a incisão longitudinal, iniciada logo abaixo da última costela; b) exposição do ovário e subsequente ligadura na região; c) ovário, parte do útero e tecidos circundantes foram removidos; d) sutura na pele; e) afastamento dos tecidos moles para exposição do fêmur; f) exposição total da região onde foi realizado o defeito ósseo; g) defeito ósseo de 2,5mm de diâmetro já confeccionado; h) inserção do material experimental no defeito ósseo..... 75
- FIGURA 2 - Período de sete dias (vista panorâmica dos defeitos experimentais): **a) grupo C:** defeito ósseo preenchido por coágulo sangüíneo em organização (◆); **b) grupo Am:** defeito ósseo preenchido por coágulo sangüíneo em organização (◆); **c) grupo A1:** defeito ósseo preenchido por coágulo sangüíneo em organização (◆). Neoformação óssea extra-cortical subperiosteal (◆); **d) grupo A2:** defeito ósseo preenchido por coágulo sangüíneo em organização (◆). Neoformação óssea extra-cortical subperiosteal (◆); **e) grupo HA1:** área do defeito ósseo, recoberto por tecido conjuntivo (*), apresentando trabéculas ósseas neoformadas (■); **f) grupo HA2:** área do defeito ósseo, recoberto por tecido conjuntivo (*), apresentando trabéculas ósseas neoformadas (■); **g) grupo A+HA:** defeito ósseo preenchido por coágulo sangüíneo em organização (◆). Neoformação óssea extra-cortical subperiosteal (◆). Aumento original de 25x; HE..... 81

FIGURA 3 - Período de sete dias: **a) grupo C:** defeito ósseo preenchido por tecido de granulação (◆) e por trabéculas ósseas imaturas (■) interpostas por espaços medulares; **b) grupo Am:** área do defeito preenchida por coágulo sangüíneo com rede de fibrina (△). Presença de esquirola óssea (×) próxima à margem do defeito (□); **c) grupo A1:** defeito ósseo preenchido por coágulo sangüíneo composto por rede de fibrina (△); **d) grupo A2:** remanescentes de coágulo sangüíneo com rede de fibrina(△). Presença de esquirola óssea (×) próxima à margem do defeito (□); **e) grupo HA1:** defeito ósseo recoberto por tecido conjuntivo fibroso (*) e preenchido por trabéculas ósseas delicadas (■). Margem do defeito ósseo (□); **f) grupo HA2:** defeito ósseo recoberto por tecido conjuntivo fibroso (*) e preenchido por trabéculas ósseas imaturas (■). Margem do defeito ósseo (□); **g) grupo A+HA:** defeito ósseo preenchido por tecido de granulação (◆). Presença de esquirolas ósseas (×). Aumento original de 100x; HE.....

83

FIGURA 4 - Período de 21 dias (vista panorâmica dos defeitos experimentais): **a) grupo C:** fechamento linear do defeito com ponte óssea (●); **b) grupo Am:** fechamento do defeito em extensão por tecido ósseo neoformado (●); **c) grupo A1:** área do defeito preenchido por tecido conjuntivo fibroso (*). Trabéculas ósseas preenchendo o canal medular (⇕) e neoformação óssea extra-cortical subperiosteal (◆); **d) grupo A2:** área do defeito preenchido por tecido conjuntivo fibroso (*). Trabéculas ósseas preenchendo o canal medular (⇕) e neoformação óssea extra-cortical subperiosteal (◆); **e) grupo HA1:** fechamento do defeito em extensão por tecido ósseo neoformado (●); **f) grupo HA2:** fechamento linear do defeito com ponte óssea (●); **g) grupo A+HA:** área do defeito preenchido por tecido conjuntivo fibroso (*), não havendo fechamento do defeito por tecido ósseo. Presença de neoformação óssea extra-cortical subperiosteal (◆). Aumento original de 25x; HE.....

86

FIGURA 5 - Período de 21 dias: **a) grupo C:** fechamento ósseo linear, com a formação de ponte óssea (●), na superfície do defeito e trabéculas ósseas subjacentes (■), interpostas por espaços medulares. Margem do defeito (□); **b) grupo Am:** fechamento do defeito ósseo em extensão (●) e trabéculas ósseas subjacentes (■). Tecido conjuntivo fibroso revestindo o defeito ósseo (*); **c) grupo A1:** defeito ósseo preenchido por tecido conjuntivo fibroso (*). Canal medular preenchido por trabéculas ósseas neoformadas (⇕). Margem do defeito ósseo (□); **d) grupo A2:** margem do defeito ósseo (□) e a presença de tecido conjuntivo fibroso (*) na área do defeito. Trabéculas ósseas neoformadas preenchendo o canal medular (⇕) e, externamente, a presença de neoformação óssea extra-cortical subperiosteal (◆); **e) grupo HA1:** fechamento ósseo superficial do defeito (●), recoberto por tecido conjuntivo fibroso (*). Trabéculas ósseas subjacentes (■), e evidente margem do defeito (□); **f) grupo HA2:** fechamento linear do defeito ósseo com a formação de ponte óssea (●) e trabéculas ósseas subjacentes volumosas (■). Margem do defeito (□); **g) grupo A+HA:** área do defeito ósseo preenchida por tecido conjuntivo fibroso. Aumento original de 100x; HE.....

88

FIGURA 6 - Período de 21 dias: **a) grupo C:** defeito ósseo preenchido por trabéculas ósseas neoformadas, apresentando osteócitos pequenos em lacunas de tamanho variado (→). Tais trabéculas estavam revestidas por osteoblastos cúbicos (⇔), em fileira, ou achatados (▶), estando circundadas por tecido hematopoiético (▶▶); **b) grupo HA2:** região do defeito ósseo preenchida por trabéculas ósseas maduras e volumosas, apresentando osteócitos pequenos em lacunas (→). As trabéculas estavam intermeadas por tecido hematopoiético (▶▶) e revestidas por osteoblastos achatados (▶); **c) grupo A+HA:** área do defeito ósseo preenchida por tecido conjuntivo fibroso (*), contendo pequenas áreas de tecido osteóide, que apresentava osteócitos volumosos no interior de lacunas (→) e, na superfície, células osteogênicas (⇔). Aumento original de 400x; HE.....

90

FIGURA 7 - Médias e desvios-padrão da neoformação óssea nos grupos experimentais (C, Am, A1, A2, H1, H2, A+HA), nos períodos de sete e 21 dias..... 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e a média proporcional de osso neoformado no interior do defeito ósseo (P/600) do grupo C, nos períodos de sete e 21 dias.....	92
Tabela 2 -	Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e a média proporcional de osso neoformado no interior do defeito ósseo (P/600) do grupo Am, nos períodos de sete e 21 dias.....	93
Tabela 3 -	Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e a média proporcional de osso neoformado no interior do defeito ósseo (P/600) do grupo A1, nos períodos de sete e 21 dias.....	93
Tabela 4 -	Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e a média proporcional de osso neoformado no interior do defeito ósseo (P/600) do grupo A2, nos períodos de sete e 21 dias.....	94
Tabela 5 -	Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e a média proporcional de osso neoformado no interior do defeito ósseo (P/600) do grupo HA1, nos períodos de sete e 21 dias.....	94

Tabela 6 -	Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e a média proporcional de osso neoformado no interior do defeito ósseo (P/600) do grupo HA2, nos períodos de sete e 21 dias.....	95
Tabela 7 -	Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e a média proporcional de osso neoformado no interior do defeito ósseo (P/600) do grupo A+HA, nos períodos de sete e 21 dias.....	95
Tabela 8 -	Estatística descritiva referente aos grupos experimentais (C, Am, A1, A2, HA1, HA2, A+HA) nos períodos de sete e 21 dias.....	97
Tabela 9 -	Análise de variância para duas variáveis estudadas.....	99
Tabela 10 -	Formação de grupos homogêneos após o teste de Tukey (5%) para as variáveis grupos experimentais e período de observação, em relação à média de neoformação óssea.....	100

CANETTIERI, A.C.V. **Reparação óssea em fêmures de ratas ovariectomizadas sob ação local do alendronato sódico, da hidroxiapatita e da associação alendronato com a hidroxiapatita.** 2006. 144f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2006.

RESUMO

Este trabalho avaliou a ação local do alendronato sódico, da hidroxiapatita e da associação alendronato com hidroxiapatita na reparação de defeitos ósseos em fêmures de ratas ovariectomizadas. Noventa e oito animais foram divididos em sete grupos: controle (C), amido (Am), alendronato 1mol (A1), alendronato 2moles (A2), hidroxiapatita 1 mol (HA1), hidroxiapatita 2moles (HA2) e associação alendronato e hidroxiapatita (A+HA). As ratas pesando, aproximadamente, 250g foram ovariectomizadas e, após trinta dias, os defeitos ósseos, medindo 2,5mm de diâmetro, foram confeccionados nos fêmures esquerdos. Os defeitos foram preenchidos com alendronato sódico, hidroxiapatita e/ou com ambos, sendo que o grupo C não recebeu material de preenchimento e o grupo Am apenas o amido. Os animais foram sacrificados sete e 21 dias após a cirurgia. Foram realizadas análise histológica e histomorfométrica da área do defeito ósseo e os resultados submetidos à análise estatística. Histologicamente, as principais diferenças ocorreram após 21 dias. Os grupos C, Am, HA1 e HA2 apresentaram fechamento linear do defeito ósseo em todos espécimes e a maioria dos animais dos grupos A1, A2 e A+HA não exibiu neoformação óssea na região central do defeito, permanecendo este preenchido por tecido conjuntivo fibroso. No período de sete dias não houve diferença estatística significativa entre todos os grupos experimentais em relação a neoformação óssea e, após 21 dias, o grupo HA2 apresentou a maior quantidade de osso neoformado. Estatisticamente, não houve diferença entre os grupos A1, A2 e A+HA nos dois períodos de estudo. Concluiu-se que o alendronato sódico, isolado ou associado com a hidroxiapatita, prejudicou a reparação óssea neste modelo experimental e a hidroxiapatita utilizada mostrou-se biocompatível e osteocondutora, com os melhores resultados observados no grupo HA2.

PALAVRAS-CHAVE: Bisfosfonatos; alendronato; hidroxiapatita; regeneração óssea; osso.

1 INTRODUÇÃO

A procura de substitutos dos enxertos ósseos tem estimulado a pesquisa de materiais sintéticos. Os enxertos ósseos autógenos apresentam eficiência mecânica e biológica, mas há limitações relacionadas com complicações na área doadora e com a sua escassez nos casos de pacientes submetidos a múltiplos procedimentos (MOREIRA et al.⁸⁵, 2003).

A hidroxiapatita tem sido bastante estudada, pois trata-se de uma substância bioativa, não tóxica, biocompatível e que se apresenta como um importante recurso para substituição óssea. O seu emprego tem sido muito diversificado. Na Odontologia a hidroxiapatita tem sua utilização amplamente difundida, como nos casos de aumento dos rebordos alveolares atróficos, no preenchimento de lojas cirúrgicas de lesões periapicais, em perdas ósseas periodontais, em revestimentos de implantes metálicos e em casos de grande perda de tecido ósseo, seja por traumatismo ou devido à extensas lesões (CARVALHO et al.¹⁸, 1993; ROSA et al.¹⁰⁵, 1998).

Situações que envolvam a necessidade de reparação óssea são mais complicadas em casos associados com desordens metabólicas, como as que ocorrem na osteoporose (FLEISCH³⁹, 1998; SPARIDANS et al.¹²⁴, 1998). Nesta doença ocorre aumento no *turnover* ósseo, decorrente, por exemplo, da deficiência estrogênica na pós-menopausa. Este aumento na taxa de remodelação óssea ocorre devido à maior osteoclastogênese, provocando perda de estrutura óssea e diminuição na mineralização do tecido ósseo, que propicia a ocorrência de fraturas ósseas (EASTELL²⁹, 2003; RODAN et al.¹⁰², 2004). A osteoporose relacionada à pós-menopausa pode ser tratada por uma

classe de compostos inorgânicos, denominados bisfosfonatos, que, de maneira geral, reduzem o *turnover* ósseo, inibindo a ação dos osteoclastos (RODAN & FLEISH¹⁰⁰, 1996). O alendronato sódico é um bisfosfonato de ampla utilização na prevenção e no tratamento da osteoporose, uma vez que sua ação pode aumentar a densidade mineral óssea da coluna vertebral e do quadril em mulheres na pós-menopausa e reduzir a incidência de novas fraturas ósseas, sendo utilizado por via oral em doses diárias ou semanais (HORWITZ et al.⁵², 2000; RODAN & MARTIN¹⁰¹, 2000; ROGERS et al.¹⁰³, 2000; SAMBROOK¹¹¹, 2003). Esse medicamento vem sendo empregado na Odontologia no controle da reabsorção óssea após cirurgias de retalho total, como auxiliar no tratamento de periodontite e associado ao material de implantes dentários, apresentando nesses casos ação local (YAFEE et al.¹⁴², 1997; MERAW et al.⁸², 1999; YOSHINARI et al.¹⁴⁶, 2001; ROCHA et al.⁹⁹, 2004).

Alguns estudos vêm sendo realizados no sentido de se associar o alendronato sódico com a hidroxiapatita e estes têm verificado o efeito dessa associação sobre a reparação óssea em defeitos cirúrgicos e como revestimento de implantes dentários, mas não utilizaram um modelo experimental animal que simule a osteoporose pós-menopausa. A associação alendronato sódico e hidroxiapatita foi criada baseada nas propriedades de controle da reabsorção óssea do alendronato e na capacidade osteocondutora da hidroxiapatita (LEW et al.⁶⁷, 1997; GANGULI et al.⁴², 2002; FERNANDES³⁴⁻⁵, 2002 e 2005). Assim, torna-se importante o estudo da ação local do alendronato sódico e da hidroxiapatita, isolados e associados, sobre a reparação óssea em quadros sistêmicos caracterizados pelo aumento na remodelação óssea, como na osteopenia/osteoporose induzida após a ovariectomia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Osteoporose pós-menopausa

Com o avanço da medicina e melhora na qualidade de vida, o número de pessoas com 60 anos está aumentando, assim como, cresce exponencialmente a quantidade de idosos com idade superior a 85 anos. Essas mudanças criam novos desafios no tratamento de doenças relacionadas a essas faixas etárias. Fatores como níveis aumentados de colesterol e hipertensão, entre outros, relacionam-se com as doenças cardiovasculares. A osteoporose é, também, uma importante preocupação em mulheres na idade pós-menopausa (STRAUS¹²⁵, 2001).

A osteoporose pode ser definida como uma redução da massa óssea a um nível suficiente para tornar o osso frágil e vulnerável à fraturas, podendo ser classificada em primária ou secundária (BRASILEIRO FILHO¹⁵, 2000). A osteoporose primária pode ser dividida em tipo I ou tipo II. A primeira se relaciona com mulheres na pós-menopausa, que apresentaram suspensão na produção de estrógenos. Os ossos mais comprometidos são os corpos vertebrais, o fêmur e o rádio. A osteoporose primária tipo II acomete tanto homens como mulheres idosos, surgindo após os setenta anos (BRASILEIRO FILHO¹⁵, 2000; RUBIN & FARBER¹⁰⁶, 2002).

Na osteoporose secundária, a perda óssea relaciona-se ou com condições sistêmicas, como o hipertireoidismo, ou com o uso de medicamentos, como os corticosteróides; ou com as deficiências nutricionais, como a má absorção de vitamina D e de cálcio; ou com neoplasias (BRASILEIRO FILHO¹⁵, 2000; RUBIN & FARBER¹⁰⁶, 2002).

Anatomicamente, a osteoporose apresenta diminuição na espessura do osso cortical, redução no número e tamanho das trabéculas do osso esponjoso, resultando em alargamento dos espaços medulares (BRASILEIRO FILHO¹⁵, 2000). No tratamento da osteoporose, pode-se utilizar a estrogoterapia e a suplementação de cálcio e vitamina D, mas uma classe de compostos inorgânicos antiosteoporóticos, os bisfosfonatos, também tem se mostrado eficiente no tratamento e na prevenção da doença (RODAN & MARTIN¹⁰¹, 2000; STRAUS¹²⁵, 2001; CRANNEY²³, 2003; EASTELL²⁹, 2003).

A deficiência estrogênica na mulher e androgênica no homem são de extrema importância no desenvolvimento da osteoporose. O aumento do número de osteoclastos na fase pós-menopausa, por exemplo, é resultado dessa suspensão na produção hormonal (RUBIN & FARBER¹⁰⁶, 2002).

Na osteoporose primária, os efeitos da deficiência hormonal não são direcionados especificamente para o osteoclasto e sim para as células do estroma medular, que secretam citocinas de ação em osteoclastos, como a interleucina-1 (Il-1) e a Il-6 (RUBIN & FARBER¹⁰⁶, 2002). Segundo Mundy⁸⁷ (1993), a Il-1 foi a primeira interleucina identificada com efeito na atividade osteoclástica, sendo uma potente estimuladora de reabsorção. Acredita-se que seu efeito é mais complexo, estimulando a proliferação osteoblástica, mas inibindo sua diferenciação e quando administrada, *in vivo*, causaria supressão da formação óssea.

Jilka et al.⁵⁷ (1992) sugeriram que a inibição, pelo estrógeno, da produção de Il-6 pelas células da linhagem osteoblástica oferece um modelo explicativo do papel protetor dos esteróides sexuais contra a osteoporose, estando a produção e a ação dessa citocina sob controle inibitório do estrógeno.

Alterações na microestrutura, mineralização, densidade óssea e espessura das trabéculas ósseas estão relacionadas com o *turnover* ósseo (RODAN et al.¹⁰² 2004). Se o *turnover* ósseo é muito rápido, como durante a deficiência aguda de estrógeno, os osteoclastos podem perfurar a estrutura óssea, não havendo mais o arcabouço no qual o osteoblasto produzia o tecido ósseo. Isso é referido como “perda óssea por perfuração” e, provavelmente, é irreversível. A perda óssea reversível ocorre quando existe aumento do número de sítios de remodelação óssea, que agem como centros de estresse permitindo a propagação de microrrachaduras. A deficiência do estrógeno resulta num aumento da taxa de remodelação óssea, pelo aumento da osteoclastogênese e, conseqüentemente, na taxa de origem de sítios de remodelação. Esse aumento da osteoclastogênese é mediado pelo efeito do estrógeno sobre o osteoblasto ou seus progenitores (EASTELL²⁹, 2003). Durante o processo fisiológico de formação óssea, a hidroxiapatita forma a matriz mineralizada e esse processo começa aproximadamente uma semana depois da deposição da matriz orgânica. A mineralização alcança cerca de 70% do seu nível máximo dentro de poucas semanas e, então, segue lentamente, através do crescimento dos cristais de hidroxiapatita, por outros dois e três anos. No *turnover* alto, como na menopausa, a média de mineralização diminui, porque o novo tecido ósseo é remodelado novamente antes da completa mineralização (RODAN et al.¹⁰², 2004). Agentes que agem contra a reabsorção óssea (bisfosfonatos, por exemplo) reduzem a intensidade da remodelação óssea, que com

velocidade mais lenta, permite a mineralização completa, restaurando a dureza do tecido ósseo (SEEMAN & EISMAN¹¹⁶, 2004).

Na prática médica atual, osteoporose é determinada quando um paciente apresenta densidade mineral óssea menor que -2,5, sendo esse valor baseado na média das densidades minerais ósseas de uma população de adultos jovens. A osteopenia é diagnosticada quando uma densidade mineral óssea se encontra entre -1 e - 2,5 (SEEMAN & EISMAN¹¹⁶, 2004).

A terapia de reposição de estrógenos foi por muito tempo considerada como de primeira linha para prevenir osteoporose em mulheres. Esse tratamento claramente inibiu a perda e o *turnover* ósseos e aumentou a densidade mineral óssea, mas está associado com um aumento bem estabelecido de risco de câncer uterino e um aumento de 20-50% no risco de neoplasias de mama, especialmente naquelas famílias com história de câncer (RODAN & MARTIN¹⁰¹, 2000; CRANNEY²³, 2003).

No modelo experimental para se estudar a osteoporose pós-menopausa emprega-se ratas ovariectomizadas, pois se estimula a perda óssea acelerada existente na mulher. Esse modelo apresenta características como as que ocorrem clinicamente com as mulheres, como o aumento na taxa de *turnover* ósseo, o índice de reabsorção óssea excedendo a de formação, a fase inicial rápida de perda óssea seguida de uma fase mais lenta, maior perda de osso trabecular que cortical, menor absorção de cálcio pelo intestino e similar resposta do sistema esquelético às terapias com estrógenos, bisfosfonatos, calcitonina e exercício físico (WRONSKI et al.¹³⁹, 1988; KALU⁶⁰, 1991; TEÓFILO et al.¹²⁹, 2003).

2.2 Os osteoclastos

O osso é um tecido conjuntivo especializado e mineralizado, cujo peso consiste em 33% de matriz orgânica, dos quais 28% são representados por colágeno tipo I e 5% por proteínas não colagenosas como a osteonectina, a osteocalcina, a proteína morfogenética óssea e a sialoproteína óssea. A matriz orgânica é permeada por cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH}_2)$), que perfazem os 67% remanescentes do osso (TEN CATE¹²⁸, 2001). Todos os ossos são revestidos em suas superfícies externas e internas por membranas conjuntivas, que possuem células osteogênicas, o periósteo e o endósteo, respectivamente (JUNQUEIRA & CARNEIRO⁵⁹, 2004).

A proliferação de células osteoprogenitoras ocorre no periósteo e endósteo associados com as bordas da fratura óssea. Tais células migram e acumulam-se no sítio de reparo e se diferenciam em osteoblastos e condroblastos, responsáveis pela formação do calo ósseo (YAN et al.¹⁴³, 1994). O contato entre periósteo e osso é essencial para a capacidade osteogênica celular e para a sobrevivência e organização do osso recém-formado. Artefatos não porosos que impedem a interação entre as células do periósteo e o osso subjacente podem levar a formação de quantidades insignificantes de osso neoformado (KOSTOPOULOS & KARRING⁶³, 1995).

No osso, células distintas são principalmente responsáveis pela formação, reabsorção e manutenção da osteoarquitetura. Os osteoblastos, provenientes das células osteoprogenitoras, são responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea. Localizam-se na superfície do osso apresentando-se como uma lâmina de células cubóides a colunares

(GARTNER & HIATT⁴⁴, 2003). Os osteoblastos aprisionados em lacunas da matriz óssea são conhecidos por osteócitos, sendo considerados células maduras responsáveis pela manutenção do tecido ósseo e apresentam baixa atividade metabólica, poucas organelas de síntese, núcleo achatado e morfologia obedecendo a forma da lacuna óssea (BREW & FIGUEIREDO¹⁷, 2003). A reabsorção do osso é feita por grandes células multinucleadas chamadas de osteoclastos. O precursor destes origina-se da medula óssea, sendo denominado de célula progenitora granulócito-macrófago (GARTNER & HIATT⁴⁴, 2003). Osteoclastos são vistos, em preparos histológicos descalcificados, situados em depressões reabsorvidas da superfície óssea, chamadas de lacunas de Howship (YOUNG & HEATH¹⁴⁵, 2001). Adjacente à superfície do tecido, a membrana celular osteoclástica emite uma grande quantidade de profundas invaginações que formam uma borda em escova ou ondulada, algumas vezes visível pela microscopia óptica em preparações histológicas. Na área da borda em escova ocorre a fixação dos osteoclastos à superfície mineralizada do osso, criando um compartimento selador, no qual a célula libera íons de hidrogênio e enzimas lisossômicas que, respectivamente, desmineralizam o tecido duro e degradam a matriz orgânica exposta (TEN CATE¹²⁸, 2001). Os osteoclastos também participam da manutenção da homeostasia do cálcio sanguíneo pela resposta ao hormônio paratireóideo (PTH) e à calcitonina, o primeiro estimulando a reabsorção osteoclástica e o outro inibindo a atividade celular (YOUNG & HEATH¹⁴⁵, 2001).

Os osteoblastos e células do estroma medular estão envolvidos na osteoclastogênese por um mecanismo que envolve contato célula-célula, pois a maturação dos osteoclastos *in vitro* requer a presença das células da medula óssea e a progênie de osteoblastos (MANOLAGAS⁷⁵, 1995; UDAGAWA¹³⁵, 2002). O osteoclasto é uma célula gigante multinucleada cuja diferenciação é mediada, principalmente, pelo

fator estimulador de colônia - macrófago (M - CSF), pelo ligante de RANK (RANK - L, *receptor activator of nuclear factor - K*) e a osteoprotegerina (OPG). M - CSF é um produto de secreção dos osteoblastos e liga-se a um receptor específico presente na superfície osteoclástica, o c-Fms. Agentes que induzem a expressão de M - CSF causam a proliferação de osteoclastos, sendo o possível mecanismo patogênico central da osteoporose humana (TEITELBAUM¹²⁷, 2000). Entretanto, o contato entre precursores osteoclásticos e células do estroma/osteoblastos é necessário, pois estudos *in vitro* demonstraram que apenas M - CSF não é suficiente para a maturação de osteoclastos (TEITELBAUM¹²⁷, 2000; DUONG & RODAN²⁸, 2001). RANK é um receptor de superfície presente nos osteoclastos que interage com RANK - L da superfície de células do estroma/osteoblastos, estabelecendo contato célula-célula e promovendo a osteoclastogênese (UDAGAWA¹³⁵, 2002). OPG é uma proteína solúvel e age como um receptor para RANK - L, competindo com RANK. Ratos deficientes em OPG exibem intensa osteoporose causada pelo aumento da função e da ativação de osteoclastos. Esses achados demonstraram que OPG é um fator chave na osteoclastogênese e na reabsorção óssea, *in vivo* (DUONG & RODAN²⁸, 2001; UDAGAWA¹³⁵, 2002). O balanço entre a expressão do estimulador da osteoclastogênese, RANK - L, e o inibidor, OPG, determina a quantidade de osso reabsorvido (TEITELBAUM¹²⁷, 2000).

Linfócitos T estimulados por antígenos e específicos para bactérias periodontopatogênicas expressam de modo constitutivo RANK - L e podem se ligar ao RANK das células precursoras de osteoclastos, e substituem, assim, as células do estroma/osteoblastos na ativação da osteoclastogênese existente na doença periodontal. Esses linfócitos CD4+ ou CD8+ diminuem em número após terapia periodontal bem sucedida (BAKER⁶, 2000).

A reabsorção óssea pelo osteoclasto é iniciada pela ligação celular à matriz óssea, que ocorre pela interação das integrinas celulares com as proteínas da matriz óssea, como a sialoproteína óssea (TEITELBAUM¹²⁶, 1993). As integrinas correspondem a uma família de receptores de aderência que participam na interação célula-célula e célula-matriz e regulam uma variedade de funções celulares, incluindo reabsorção óssea osteoclástica, agregação plaquetária, ativação de leucócitos, metástases e apoptose (DUONG & RODAN²⁸, 2001). A interação célula-matriz é resultado da formação da “zona clara”, uma área citoplasmática que apresenta uma membrana plasmática aderida ao osso (membrana seladora), que circunda a borda ondulada e sela o compartimento de reabsorção, isto é, o espaço extracelular na qual ocorre a reabsorção óssea. A membrana seladora não é lisa, apresentando, ao invés, projeções em formas de dedos, os podosomos, que apresentam microfilamentos associados com as integrinas, responsáveis pela ligação celular ao osso (TETI et al.¹³⁰, 1991).

O contato do osteoclasto com a superfície óssea induz uma polarização celular e organização de um aparelho de reabsorção e a conseqüente formação de um microambiente altamente ácido na interface osteoclasto-osso. Esse transporte de elétrons para o microambiente é responsabilidade de uma H-ATPase funcional, imunológica e estruturalmente similar à bomba de prótons das células intercalares dos túbulos renais (TEITELBAUM¹²⁶, 1993; ZAIDI et al.¹⁴⁷, 1993).

2.3 Bisfosfonatos

Os bisfosfonatos foram usados primeiramente nas indústrias como inibidores de corrosão e somente há três décadas se tornaram drogas relacionadas a doenças do metabolismo do cálcio. Os efeitos biológicos, no vivo, podem ser a inibição da calcificação, quando em altas doses, e a inibição da reabsorção óssea. A seletividade dos bisfosfonatos, na sua habilidade em inibir reabsorção óssea, é determinada pela alta avidéz desses compostos em se ligar a matriz óssea mineralizada, uma etapa essencial para a supressão da reabsorção óssea mediada por osteoclastos (RUSSEL & ROGERS¹⁰⁷, 1999).

Bisfosfonatos diferem do pirofosfato inorgânico (P-O-P), pois têm carbono ao invés do átomo de oxigênio que se liga aos resíduos fosfato (P-C-P). Pirofosfato inorgânico é um polifosfato de ocorrência natural, considerado um subproduto de reações biossintéticas do organismo, estando presente no soro e que pode inibir a calcificação ligando-se aos cristais de hidroxiapatita e é considerado um agente regulador da mineralização óssea impedindo que esta ocorra em tecidos moles. O núcleo P-C-P dos bisfosfonatos é responsável pela forte afinidade do bisfosfonato ao osso e permite um número de variação na sua estrutura, baseada na substituição das posições R1 e R2 no átomo de carbono. A habilidade dos bisfosfonatos em se ligarem ao mineral ósseo previne o crescimento e a dissolução de cristais, sendo maior quando a cadeia lateral R1 é um grupo hidroxila (como no etidronato). A cadeia lateral R2 determina a potência do bisfosfonato, sendo constituída por - CH₃ no etidronato, - CH₂CH₂CH₂NH₂ no alendronato e - CH₂CH₂NH₂ no pamidronato (RUSSEL & ROGERS¹⁰⁷, 1999).

Os bisfosfonatos podem ser usados no controle da remodelação óssea acelerada presente na Doença de Paget, aliviando, sobretudo, a sensação dolorosa do paciente. Na osteoporose, essas drogas são inibidores da reabsorção óssea prevenindo a perda óssea, resultando num período definido onde a formação óssea é maior que a reabsorção, até que um novo equilíbrio seja alcançado, reduzindo em 50% a incidência de novas fraturas nas vértebras e no quadril. Os bisfosfonatos podem também retardar a reabsorção óssea secundária a uma invasão tumoral, diminuindo a hipercalemia induzida por essas neoplasias malignas (FLEISCH³⁹, 1998; SPARIDANS et al.¹²⁴, 1998; POMA et al.⁹⁴, 1999; SAUNDERS et al.¹¹⁴, 2004).

O mecanismo de ação dos bisfosfonatos relaciona-se com a diminuição da ação dos osteoclastos, resultando numa queda da geração de novas unidades de remodelação óssea. A ação de todos bisfosfonatos é a redução no *turnover* ósseo, mas em animais e humanos houve aumento na quantidade de osso formado após o tratamento (RODAN & FLEISCH¹⁰⁰, 1996; MANOLAGAS⁷⁶, 2000). Há várias explicações para isso, e uma delas é inerente ao próprio *turnover* ósseo, pois uma redução na reabsorção óssea pode não ser imediatamente seguida pela diminuição da formação óssea, desde que a formação óssea nos sítios de remodelação se iniciou antes do tratamento e irá ocorrer até se completar. A diminuição no *turnover* ósseo pode aumentar o depósito mineral nos ossos, pois o osso neoformado terá menos chance de ser remodelado e irá, portanto, existir maior tempo para completar a mineralização. Demonstrou-se que 70% da mineralização do osso neoformado ocorre dentro das primeiras semanas, mas o enriquecimento mineral continua por longo tempo (RODAN & FLEISCH¹⁰⁰, 1996).

Os bisfosfonatos apresentam uma alta afinidade por hidroxiapatita e ficam retidos no osso na forma inativa, sendo liberados localmente durante o processo de reabsorção óssea, com ação preferencial sobre os 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 e, conseqüentemente, no número de osteoclastos, possivelmente por indução da apoptose celular. Essa 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. Sugeriu-se, também, um efeito indireto dos bisfosfonatos mediado pelos osteoblastos, que liberariam inibidores de atividade e do recrutamento osteoclástico (SPARIDANS et al.¹²⁴, 1998).

Após administração por via oral, os bisfosfonatos são rapidamente removidos do plasma pela excreção renal ou pela rápida captação pelo tecido ósseo. O alendronato sódico tem uma taxa de 50-60% de retenção no osso. Quando o bisfosfonato é incorporado ao osso, a meia vida é extremamente longa, para mais de dez anos, relacionando-se com o tempo de *turnover* do sítio esquelético. (LIN et al.⁶⁹, 1991; GANGULI et al.⁴², 2002). A rápida remoção do plasma e a ligação específica do bisfosfonato à hidroxiapatita gera quase uma ausência de efeitos tóxicos sistêmicos. O alendronato sódico pode causar esofagite pela interação direta do comprimido deglutido com a mucosa esofagiana (FLEISCH³⁹, 1998).

2.3.1 Mecanismo de ação dos bisfosfonatos

Estudos recentes mostraram que os bisfosfonatos podem ser classificados em dois grupos que diferem pelo modo de ação. Bisfosfonatos que mais se assemelham ao pirofosfato (como o clodronato e etidronato) podem ser incorporados metabolicamente em análogos não hidrolizáveis de ATP. O acúmulo desses metabólitos dentro dos osteoclastos inibe a função celular causando sua morte. Em contraste, bisfosfonatos que contêm nitrogênio na fórmula, que são mais potentes, como o alendronato e o risedronato, interferem com outras reações metabólicas, por exemplo, na via do mevalonato. Esta é uma via biossintética responsável pela produção de colesterol e lipídios isoprenóides como o isopentenil difosfato (IPP), farnesildifosfato (FPP) e geranylgeranyl difosfato (GGPP). FPP e GGPP participam da modificação lipídica postranslacional (prenilação) de pequenas GTPases como Ras, Rho, Rac e Rab. A prenilação envolve a transferência de lipídeos de grupos farnesil e geranylgeranyl para um resíduo de cisteína da GTPase, permitindo que esta se ancore nas membranas celulares. Esses bisfosfonatos alterando a atividade dessas GTPase, interferem na função osteoclástica (RUSSEL & ROGERS¹⁰⁷, 1999).

Van Beek et al.¹³⁶ (1999) analisaram o efeito dos bisfosfonatos que contêm nitrogênio na composição (risedronato, ibandronato, olpadronato e pamidronato) e do clodronato (sem nitrogênio) sobre as enzimas da via do mevalonato: farnesil difosfato sintase (FPP sintase) e geranylgeranyl difosfato sintase, (GGPP sintase). Os autores concluíram que os bisfosfonatos com nitrogênio agiram intracelularmente nos osteoclastos inibindo a enzima FPP sintase, mas não a GGPP sintase, e que o clodronato não agiu inibindo a via mevalonato. Esses estudos revelaram pela primeira vez o alvo intracelular dos

aminobisfosfonatos e determinaram que nem todos os bisfosfonatos compartilham o mesmo mecanismo molecular de ação.

Fisher et al.³⁸ (1999) analisaram o ponto de bloqueio pelo alendronato na via do mevalonato de osteoclastos. Essa via se inicia com a enzima hidroximetilglutaril - Coa redutase (HMG-CoA) e tem como componentes intermediários o mevalonato e, na seqüência, o geranylgeranyl difosfato (GGPP). Além do alendronato, os autores utilizaram um inibidor da HMG-Coa, a lovastatina, e um substituto metabólico do GGPP, o geranylgeraniol. Em cultura de calvária murina, o efeito da lovastatina sobre os osteoclastos foi inibido pelo acréscimo na cultura de mevalonato e geranylgeraniol, e o do alendronato foi prevenido pela adição de geranylgeraniol. Esses achados reforçaram a idéia que o alendronato age diretamente sobre osteoclastos, inibindo uma etapa na via de biossíntese do colesterol (via do mevalonato), que controla a reorganização do citoesqueleto, apoptose e processos envolvidos na ativação osteoclástica.

Rogers et al.¹⁰³ (2000) esclareceram pontos importantes nos mecanismos de ação dos dois grandes grupos de bisfosfonatos. Bisfosfanatos com nitrogênio, inibindo a via do mevalonato, principalmente a FPP sintase, prejudicam a prenilação das GTPases de membrana. Essas GTPases ancoradas nas membranas sinalizam e regulam uma variedade de processos osteoclásticos, como a manutenção da borda ondulada, do citoesqueleto de actina e da bomba de próton-ATPase de membrana. Desse modo, tais funções celulares são inibidas por essa classe de bisfosfonatos. Já o clodronato e etidronato, pela semelhança com pirofosfato inorgânico, podem ser incorporados em vias metabólicas e serem metabolizados em análogos não hidrolizados de ATP, com o metabólito AppCl₂p derivado do clodronato. Esse acúmulo

inibe numerosas enzimas intracelulares, desempenhando um efeito citotóxico e induzindo a apoptose.

Halasy-Nagy et al.⁴⁸ (2001) estudaram se a indução da apoptose era o efeito dos bisfosfonatos sobre os osteoclastos. Para isso, analisaram dois grupos de drogas alendronato/risedronato e clodronato/etidronato em cultura de células, introduzindo ou não um inibidor da apoptose. Bisfosfonatos que continham nitrogênio inibiram a reabsorção óssea em doses dez vezes mais baixas que aquelas que reduziram o número de osteoclastos, por apoptose, e o inibidor da apoptose não diminuiu a inibição da reabsorção. Por outro lado, o inibidor bloqueou o efeito inibitório sobre a reabsorção desenvolvida pelo etidronato e clodronato. Os autores concluíram que esses dados reforçaram a diferença existente entre os dois grupos de bisfosfonatos. Enquanto o etidronato e o clodronato inibiram a reabsorção óssea pela morte do osteoclasto, o alendronato e o risedronato inibiram a reabsorção óssea pela via que controla a borda ondulada, sendo a indução da apoptose, nesse caso, um evento possivelmente secundário.

2.3.2 Alendronato sódico

O alendronato é o bisfosfonato mais amplamente utilizado para o tratamento da osteoporose. É um fármaco, cujo nome químico é 4-amino-1-hidroxi-butano bisfosfonato de sódio, derivado do ácido alendrônico. Fabricado como sal monossódico do ácido alendrônico, o alendronato encontra-se, freqüentemente, na forma triidratada. Apresenta-se na forma de um pó fino e branco e possui comportamento anfótero, visto que sua estrutura possui característica ácida (dois grupo fosfóricos) e básica (grupo amina). O alendronato é solúvel em água, muito pouco solúvel em metanol e propilenoglicol e é

praticamente insolúvel em acetona, clorofórmio, álcool isopropílico e ácido acético glacial (RIBEIRO & VOLPATO⁹⁸, 2005).

Diversos estudos clínicos utilizando alendronato sódico são encontrados na literatura e abrangem assuntos como a dose ideal do medicamento a ser utilizada, o efeito do mesmo sobre a incidência de fraturas em mulheres na pós-menopausa, a associação do alendronato com outras terapias medicamentosas, a ação deste fármaco como auxiliar no tratamento de periodontite em mulheres na pós-menopausa e os efeitos colaterais com o uso diário do medicamento. Esses temas serão abordados a seguir, nessa seqüência.

Kulak & Bilezibian⁶⁴ (2000) demonstraram que a biodisponibilidade do alendronato sódico é de apenas 0,7%, o que serve de alerta para o controle da dose administrada do medicamento. Assim, Fleisch³⁹ (1998) percebeu que dose mais favorável pareceu ser a de 10mg por dia, pois estudou 994 mulheres tratadas com alendronato, com idades variando de 45 a oitenta anos, que apresentaram aumento de 7-8% na densitometria óssea e decréscimo na incidência de fraturas. Liberman et al.⁶⁸, 1995, confirmaram esse dado num estudo com 994 mulheres com osteoporose pós-menopausa medicadas com doses diárias diferentes de alendronato, sendo 5 ou 10mg por três anos ou 20mg por dois anos seguido por 5mg por mais um ano. A dose de 5mg foi a menos efetiva e os regimes de 10mg ou o de 20mg/5mg foram similares no resultado, com redução na ocorrência de novas fraturas vertebrais (48%), nas deformidades vertebrais (33%) e na perda de altura (35%).

Masud & Giannini⁷⁷ (2003) descreveram que o resultado clínico mais importante no tratamento da osteoporose foi a redução de fraturas e que as terapias atuais com bisfosfonatos foram as mais estudadas, principalmente, em relação aos etidronato, alendronato e

risedronato. Os autores citaram que o alendronato e o risedronato apresentaram as mais fortes evidências de redução nas fraturas vertebrais e não-vertebrais. Iwamoto et al.⁵³ (2003) avaliaram 25 mulheres de 63-84 anos com fraturas vertebrais em decorrência da osteoporose e tratadas com alendronato (5mg/dia) por seis meses, obtendo redução da reabsorção óssea e do quadro doloroso de modo significativo. Reforçando esses trabalhos, Bauer et al.⁹ (2004) perceberam que 3.105 mulheres na pós-menopausa tratadas com alendronato (10mg/dia) por um ano apresentaram poucas fraturas vertebrais e não vertebrais devido a redução ocorrida no *turnover* ósseo pelo uso do medicamento.

Greenspan et al.⁴⁷ (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, mas Eviö et al.³¹ (2004) compararam o efeito das terapias com alendronato (10mg/dia) e reposição hormonal (estradiol) combinadas e isoladas, em mulheres entre 65-80 anos, por dois anos, e concluíram, que a terapia combinada não ofereceu ganho extra na massa óssea quando comparada com cada tratamento isolado e somente a terapia hormonal aumentou significativamente a densidade óssea na cabeça de fêmur depois de um e dois anos. Sambrook et al.¹¹² (2003) estudaram em 195 indivíduos o efeito do alendronato(10mg/dia), do calcitriol e da vitamina D na prevenção e tratamento da perda óssea induzida por glicocorticóides. 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.

Manolagas⁷⁶ (2000) afirmou que o tratamento a longo prazo com alendronato provocou aumento no número e na atividade de osteoblastos, demonstrando que os bisfosfonatos além de inibir a reabsorção óssea, pode apresentar um efeito positivo na formação óssea. Torregrosa et al.¹³³ (2003) estudaram o efeito do alendronato (10mg/dia) em 14 pacientes transplantados renais e com osteoporose induzida pelo uso de corticosteróides, por um ano, verificando que 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. Esse aumento na densidade mineral óssea com a utilização do alendronato foi verificado, também, por Ensrud et al.³⁰ (2004), que avaliaram em 1099 mulheres de 60-86 anos os efeitos da manutenção e da interrupção do tratamento por mais de três anos. Os autores detectaram, que o tratamento contínuo com o alendronato mostrou ser mais eficiente. Esses dados foram complementados por Rodan et al.¹⁰² (2004), que descobriram a inexistente diferença entre o tratamento de curto período de tempo (três-seis meses) e o tratamento de longo prazo (dez anos) em relação a inibição da reabsorção óssea, durante a administração contínua do alendronato (10mg/dia), pois a retenção do alendronato no osso não deve aumentar ou contribuir para a atividade farmacológica do medicamento recém administrado. Na mesma linha de pesquisa, Ozdemir & Rodoplu⁹⁰ (2005) avaliaram o tratamento com alendronato (10mg/dia) em 117 mulheres na pós-menopausa por três anos, analisando as densidades minerais ósseas na coluna vertebral, quadril e cabeça de fêmur, e constataram que o maior aumento na densidade mineral, no grupo com três anos de tratamento, foi significativo nos primeiros e segundos anos, mas a terapia contínua com a droga foi importante para a manutenção dos valores da densidade óssea.

Orwoll et al.⁸⁹ (2000) analisaram o efeito do alendronato (10mg/dia) na densidade mineral óssea em 241 homens com osteoporose e verificaram que no grupo tratado houve aumento na densidade mineral óssea de 71% na coluna lombar e 2,5% na cabeça de fêmur e menor incidência de novas fraturas vertebrais. Gonnelli et al.⁴⁵ (2003) avaliaram, também, o efeito do alendronato no tratamento da osteoporose em homens, por três anos, concluindo que o medicamento aumentou a densidade mineral óssea na coluna lombar em 4,2% após um ano, 6,3% após dois anos e 8,8% após três anos.

Rocha et al.⁹⁹ (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 a 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 essa droga ser útil no tratamento periodontal de mulheres na pós-menopausa.

As lesões esofágicas associadas ao uso de alendronato de sódio não são freqüentes e parecem estar relacionadas ao uso incorreto da medicação (FLEISCH³⁹, 1998). Fernandes et al.³³ (2002) relataram quatro casos de pacientes com esofagite ulcerativa associada ao uso do alendronato. Obteve-se a remissão completa dos sintomas após a suspensão da droga. Blumel et al.¹² (2003) avaliaram, em 75 voluntários de 45-58 anos de idade, os efeitos colaterais do alendronato quando administrado diária ou semanalmente em tabletes com ou sem revestimento de proteção entérica. Os autores concluíram, que o uso

semanal do alendronato, com ou sem cobertura, estava associado a um quadro de menor sintomatologia, como azia e náusea. Sambrook¹¹¹ (2003), também, verificou que a dose semanal foi segura e pareceu ser tão eficaz quanto a administração diária, promovendo uma melhor comodidade ao paciente. Biswas et al.¹¹ (2003) avaliaram, por questionários enviados a médicos ingleses, os principais efeitos colaterais e as razões para o corte no tratamento com alendronato, em 11.916 pacientes com osteoporose pós-menopausa. Os autores encontraram, como principais condições, náuseas e vômitos, dor abdominal, dispepsia, esofagite e refluxo esofageano. Reações adversas mais severas, possivelmente relacionadas ao alendronato, foram os relatos únicos de angioedema, eritema multiforme, hipercalcemia e hipocalcemia.

O alendronato sódico tem sido avaliado em estudos experimentais em animais e *in vitro* em cultura de células, sendo alguns destes trabalhos abordados a seguir.

Sato et al.¹¹³ (1991) estudaram o modo de ação do alendronato marcado com ³H injetado em ratos recém-nascidos e adultos. Os autores constataram que, em recém-nascidos, o alendronato marcado foi encontrado no interior do osso formado, indicando crescimento normal e deposição da matriz óssea no topo da superfície óssea que continha o medicamento. Osteoclastos de animais adultos tratados com o hormônio da paratireóide mais o alendronato perderam a borda ondulada, mas não a zona clara. Estudos *in vitro*, detectaram que o alendronato inibiu a reabsorção óssea quando a sua quantidade estimada na superfície óssea foi cerca de $1,3 \times 10^{-3}$ fmol/ μm^2 , o qual produziu uma concentração de 0,1-1mM no espaço de reabsorção, se 50% da droga fosse liberada. Os autores sugeriram que após o alendronato se ligar à superfície de reabsorção, este foi localmente liberado pela acidificação causada pelo osteoclasto, e a droga, após atingir uma certa concentração no espaço

definido como zona clara, provocou a inibição da reabsorção gerada pelo osteoclasto, que perdeu a borda ondulada sem ser morto.

Lin et al.⁷⁰ (1991) avaliaram a absorção e a deposição do alendronato marcado por ^3H ou ^{14}C em animais laboratoriais. Após administração intravenosa, o alendronato foi rapidamente removido do plasma, captado pelo osso ou excretado pelos rins, sendo que 30-40% da dose administrada foi excretada em 24h. Houve pouco ou nenhum acúmulo da droga nos tecidos não calcificados e somente uma pequena fração da mesma foi excretada pela bile. A 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 comparação das concentrações do alendronato no osso de ratos em jejum (alendronato ^3H) e após alimentação (alendronato ^{14}C) indicou que a presença do alimento causava uma queda de seis a sete vezes na absorção da droga. A meia vida do alendronato foi cerca de duzentos dias em ratos e mil dias em cães. Os autores detectaram também que o alendronato é metabolicamente estável, pois não houve evidência de metabólitos da droga na urina.

Sahni et al.¹⁰⁹ (1993) desenvolveram um experimento utilizando uma linhagem de osteoblastos (CRP 10/30) promotora da reabsorção óssea *in vitro* pela ação sobre osteoclastos. Essa linhagem celular foi pré-tratada, por cinco minutos, com diferentes bisfosfonatos (etidronato, clodronato, pamidronato, alendronato) e, na seqüência, cultivada em contato com osteoclastos e obteve-se inibição da atividade reabsortiva de osteoclastos sobre o marfim. Contudo, essa inibição não foi evidente quando os osteoclastos foram pré-tratados com os medicamentos, por cinco minutos, e, subseqüentemente, cultivados com CRP 10/30 não tratadas. Na conclusão, os autores afirmaram que parte

da inibição osteoclástica, exercida pelos bisfosfonatos, foi mediada pelos osteoblastos.

Weinreb et al.¹³⁸ (1994) estudaram o efeito do alendronato, administrado por via intravenosa, na redução da perda óssea alveolar causada por periodontite experimental em macacos, após as ligaduras em dentes molares inferiores na junção esmalte-cimento e, subsequente, inóculo com *Porphyromonas gingivalis*. Nos animais que receberam placebo foi observada significativa perda óssea na junção esmalte-cimento e na furca, enquanto no grupo tratado com alendronato (0,05mg/Kg) houve redução significativa da perda óssea em ambos sítios. Os autores sugeriram que alendronato pode reduzir a reabsorção óssea alveolar associada com a periodontite.

Reddy et al.⁹⁷ (1995) avaliaram o efeito do alendronato na perda óssea em periodontite induzida por ligaduras dentárias, em cães *beagles*, pela análise digital de imagens radiográficas e análise histológica. O alendronato não influenciou os aspectos clínicos de acúmulo de placa e inflamação gengival, mas, no grupo tratado com a droga, observou-se menor mobilidade dentária, maior densidade mineral óssea e menor perda de inserção das fibras gengivais. Os autores concluíram que o alendronato pode ser benéfico no tratamento da perda óssea alveolar associada à doença periodontal.

Yafee et al.¹⁴¹ (1995) avaliaram a ação do alendronato sobre o fenômeno acelerado regional (RAP), que ocorre após o deslocamento do retalho mucoperiosteal de espessura total e é marcado pela reabsorção óssea acelerada seguida por lenta regeneração óssea. O alendronato foi aplicado topicamente nas doses de 0,15, 0,75 e 1,5 mg/ml sob retalhos mucoperiosteais nas mandíbulas de ratos ou por via intravenosa na dose de 0,5 mg/Kg de peso. Os autores perceberam que o

uso tópico do alendronato não gerou efeito sobre o RAP, no entanto, quando aplicado de modo intravenoso, houve a redução estatisticamente significativa na reabsorção óssea mandibular.

Vitté et al.¹³⁷ (1996) avaliaram o efeito do alendronato e do ibandronato, nas concentrações de 10^{-7} M, sobre a cultura de osteoblastos da linhagem CRP 10/30. Segundo os autores, as drogas induziram a síntese pelos osteoblastos de um inibidor de osteoclastos, uma proteinase lábil com peso molecular entre 1–10 kDa, que reduziu a formação de cavidades de reabsorção em mais de 50%. Os autores concluíram que os osteoblastos, além de mediar a atividade de reabsorção dos osteoclastos, podiam inibir ainda a reabsorção óssea pela síntese, induzida pelos bisfosfonatos, de um inibidor da atividade osteoclástica.

Nishikawa et al.⁸⁸ (1996) estudaram os efeitos dos bisfosfonatos alendronato e YM175 (dihidrogênio - cicloheptilamino - metilenobisfosfonato) sobre a osteoclastogênese em cultura de células de medula óssea de ratos com ou sem osteoblastos. O efeito inibidor das drogas sobre a osteoclastogênese, detectada pela contagem de células multinucleadas fosfatase ácida tartarato resistentes positivas, só ocorreu em cultura de medula óssea acrescida de osteoblastos ou do sobrenadante de cultura osteoblástica. Os autores sugeriram que parte do efeito inibitório de osteoblastos sobre osteoclastos, induzido pelos bisfosfonatos, ocorreu pela liberação de fatores solúveis pelos osteoblastos.

Peter et al.⁹² (1996) examinaram o efeito do alendronato sobre o reparo de fratura induzida cirurgicamente nos raios de cachorros *beagles*. Nos cachorros que receberam a droga durante o período de cicatrização óssea (16 semanas) os calos ósseos foram duas a três vezes

maiores que naqueles que receberam o placebo, mas não tinham sido remodelados completamente até o final do estudo. A histomorfometria demonstrou que o alendronato não inibiu a formação óssea ou a mineralização. Os autores constataram, também, por testes mecânicos, que o alendronato não prejudicou a resistência óssea na região da fratura.

Yafee et al.¹⁴² (1997) avaliaram, num segundo estudo, o efeito do alendronato aplicado topicamente embebido em esponja cirúrgica sobre a superfície do osso exposto, após a execução de um retalho mucoperiosteal em mandíbulas de ratos, no intuito de inibir a reabsorção óssea induzida (RAP). Os autores constataram que o alendronato liberado localmente reduziu significativamente a reabsorção óssea ativada pela cirurgia de retalho, sugerindo a aplicação do alendronato nessas situações.

Pietschmann et al.⁹³ (1998) avaliaram *in vitro* o efeito do alendronato (100 μ M) sobre a resposta inflamatória, dosando as citocinas liberadas e a migração de células mononucleares através de uma camada de células endoteliais. Os autores perceberam aumento na porcentagem de células mononucleares que migraram através da camada de endotélio, assim como, o aumento na expressão, pelas células mononucleares, de moléculas de aderência intercelular (ICAM-1), na presença de alendronato. Tais células aumentaram, também, a produção de citocinas pró-inflamatórias, como Il-1 β , fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN - γ).

García-Moreno et al.⁴³ (1998) analisaram o efeito direto do alendronato, nas concentrações de 10⁻¹ a 10⁻¹²mol/L, sobre a viabilidade celular, a síntese de colágeno e a capacidade de mineralização de osteoblastos normais humanos em cultura. As concentrações entre 10⁻⁵ e 10⁻¹²mol/L não exerceram efeito na

capacidade proliferativa celular, no entanto, em concentração igual ou maior que 10^{-4} mol/L, a viabilidade osteoblástica foi afetada. A síntese de colágeno diminuiu após a incubação com alendronato, mas nenhum efeito da droga foi observado sobre o depósito de cálcio por osteoblastos na concentração igual ou menor que 10^{-5} mol/L.

Makkonen et al.⁷⁴ (1999) analisaram *in vitro* o efeito do alendronato e do clodronato sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos RAW 264. Alendronato causou aumento na liberação de IL-1 β somente quando lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) foi inserido em conjunto na cultura, sugerindo que o alendronato interferiu na via de sinalização envolvida com a ativação de genes do macrófago, que o LPS estimula. Em contraste, o clodronato preveniu a liberação de citocinas, provavelmente, porque foi metabolizado em um análogo do ATP (AppCl₂p), que se acumulou intracelularmente.

Meraw & Reeve⁸¹ (1999) avaliaram o efeito local da liberação do alendronato sobre a regeneração óssea no interior do defeito criado pela colocação de um implante dentário. A análise foi realizada em seis cachorros, que receberam implantes dentários de dois tipos (revestido com hidroxiapatita ou de titânio polido) logo após a extração dos pré-molares inferiores. Foram criados subgrupos para cada tipo de implante, pois metade deles recebeu tratamento superficial com alendronato. Após 28 dias da cirurgia, o osso adjacente ao implante foi avaliado através da microscopia digital computadorizada. Os autores concluíram, que a aplicação local do alendronato resultou em um aumento significativo na quantidade de osso na área periférica dos implantes em ambos tipos estudados.

No mesmo estudo descrito anteriormente, considerando o mesmo grupo e materiais, Meraw et al.⁸² (1999) avaliaram a taxa de

formação óssea através de marcadores fluorescentes administrados por via intravenosa durante o experimento. Os resultados indicaram um efeito positivo significativo do alendronato aplicado localmente nos dois tipos de implantes, assim como nos implantes com hidroxiapatita apenas, no aumento da taxa de formação óssea. Adicionalmente, o alendronato teve um efeito significativo sobre o contato implante-osso, com um aumento no modelo com titânio polido e uma diminuição no modelo com hidroxiapatita. Por outro lado, os implantes apenas com cobertura de hidroxiapatita apresentaram um aumento no contato implante-osso.

Binderman et al.¹⁰ (2000) estudaram a ação local e a distância do alendronato sobre o processo de reabsorção óssea que ocorre após o deslocamento de um retalho mucoperiosteal, em ratos. Num primeiro grupo, após o deslocamento do retalho e exposição óssea, o medicamento foi aplicado topicamente com o auxílio de uma esponja cirúrgica embebida com a droga nas concentrações de 10, 50, 200 ou 400 μ g/mL. No segundo grupo a esponja embebida com alendronato nas concentrações de 50, 200 ou 400 μ g/mL foi posicionada na submucosa da bochecha numa região distante e no lado oposto a do sítio cirúrgico. Após análise das imagens radiográficas, os autores concluíram que a aplicação tópica nas duas maiores concentrações de alendronato foi significativamente efetiva na redução da perda óssea alveolar local e, que na concentração de 400 μ g/mL, o bisfosfonato apresentou efeito sistêmico, reduzindo a reabsorção óssea no local da cirurgia.

Silva¹¹⁸ (2000) avaliou a ação do alendronato sódico na reparação óssea em tíbias de ratas ovariectomizadas utilizando doses diferentes do medicamento por até 14 dias. A análise histológica demonstrou deposição de trabéculas maduras e organizadas na dose diária de 0,5mg/kg, o que mostrou ser a ação do alendronato dose-dependente.

Fayad³² (2001) avaliou duas formulações de bisfosfonatos (alendronato e clodronato) na reparação óssea em mandíbulas de ratos, sendo os medicamentos administrados a partir do dia da cirurgia ou cinco dias anteriormente ao feitiço do defeito ósseo, por um período de até sessenta dias de tratamento. O autor concluiu que a administração prévia à confecção do defeito ósseo não apresentou ação benéfica no reparo ósseo.

Da Paz et al.²⁴ (2001) avaliaram o efeito do 17 β -estradiol (30 μ g/Kg) ou alendronato (0,1 mg/Kg), administrados por via subcutânea, após ovariectomia e por mais seis semanas, sobre os fêmures de ratas, através da densitometria, histomorfometria e análise bioquímica (dosagem de osteocalcina). O grupo controle (ovariectomizado, mas não medicado) apresentou uma diminuição geral no volume trabecular. No grupo tratado com alendronato, houve um aumento no número de trabéculas, embora o aumento na espessura das trabéculas ósseas ocorresse somente no grupo com reposição hormonal. Houve uma diminuição no *turnover* ósseo em ambos grupos medicados. A densidade mineral óssea foi significativamente mais baixa no grupo controle e maior no grupo tratado com alendronato. Os autores concluíram, que, embora as duas drogas fossem efetivas na inibição da perda óssea, o alendronato mostrou-se mais eficiente que o estradiol, nas doses utilizadas, no aumento da massa óssea.

Jianhua et al.⁵⁶ (2002) avaliaram o efeito do alendronato nas propriedades estruturais dos ossos vertebrais de cães. O grupo tratado diariamente a 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 nas estruturas ósseas avaliadas.

Toyraş et al.¹³⁴ (2003) investigaram se a citotoxicidade e a produção de citocinas induzidas pelo alendronato poderiam ser neutralizadas pelo clodronato e pelos produtos da via do mevalonato. O tratamento com alendronato aumentou a secreção de Il-1 β , Il-6 e TNF α pelos macrófagos em cultura, sendo citotóxico para os mesmos, que demonstraram diminuição na viabilidade celular. O clodronato provocou a neutralização do efeito do alendronato, o que não foi demonstrado pelos produtos da via do mevalonato.

Altundal & Gvener⁴ (2004) examinaram o efeito do alendronato sobre a reabsorção óssea alveolar que acompanha uma extração dentária, em mandíbulas de ratos. Os autores criaram dois grupos de estudo, um que recebeu solução salina e o outro, alendronato (0,25mg/Kg) administrados por via subcutânea, diariamente e por duas ou quatro semanas, após a realização da cirurgia. Foram avaliados os níveis de cálcio no soro e na urina e, histologicamente, o número de osteoblastos, de osteoclastos e a espessura dos ossos alveolares por lingual e vestibular. O grupo medicado apresentou os melhores resultados. A redução do volume ósseo alveolar lingual e vestibular foi menor quando comparado ao grupo controle, assim como houve redução no número de osteoclastos e nas dosagens de cálcio, revelando uma importante supressão da reabsorção óssea no grupo tratado com alendronato.

Duarte et al.²⁷ (2004) avaliaram o impacto da terapia com alendronato e da reposição hormonal (com 17 β 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 sobre a perda óssea relacionada com a periodontite.

Kawata et al.⁶¹ (2004) analisaram o efeito do alendronato dissolvido em solução salina a 10^{-4} M sobre a reabsorção de enxerto ósseo autólogo inserido no subcutâneo de camundongos. Os autores perceberam, que no grupo não medicado (controle), o enxerto desapareceu em cinco semanas, enquanto que no grupo experimental houve uma redução de somente 20-40%, sendo isso constatado no exame radiográfico. Os autores, também, subdividiram o grupo experimental em dois grupos que receberam ou não nova injeção intraperitoneal de alendronato após cinco semanas da realização do enxerto. Esse grupo medicado demonstrou redução significativa no número de osteoclastos após nove semanas da cirurgia. Os autores concluíram que o alendronato na concentração de 10^{-4} M inibiu a reabsorção óssea do enxerto ósseo ectópico.

Pytlík et al.⁹⁵ (2004) avaliaram histomorfometricamente o efeito da administração simultânea e por via oral, de alendronato (3mg/kg) e vitamina A (retinol) sobre a massa óssea e o conteúdo mineral em tíbias, fêmures e vértebras de ratas ovariectomizadas. O alendronato sozinho inibiu o desenvolvimento das alterações ósseas induzidas pela ovariectomia e o retinol, aplicado isoladamente, as intensificou. Os autores perceberam que retinol, administrado simultaneamente com alendronato, atenuou o efeito de anti-reabsorção do bisfosfonato sobre os ossos analisados.

Na mesma linha de pesquisa, Sliwinski et al.¹²² (2004) investigaram o efeito da administração de alendronato e vitamina A sobre as propriedades mecânicas (testes de deformação e compressão) dos fêmures de ratas ovariectomizadas. Os resultados obtidos após a

administração simultânea de alendronato e retinol demonstraram uma associação desfavorável, pois o retinol diminui a ação protetora do alendronato sobre a deficiência estrogênica.

Altundal & Gursoy³ (2005) investigaram a influência do alendronato sobre a formação óssea em casos de enxertos ósseos autógenos em ratos. O enxerto foi obtido em fêmures de ratos através da utilização de broca trefina e, na seqüência, tal tecido foi inserido num defeito ósseo criado a 5mm de distância da área doadora. Os animais receberam, por via subcutânea, alendronato a 0,25mg/Kg ou solução salina. Os autores analisaram os níveis séricos de cálcio, da fosfatase alcalina e da osteocalcina, assim como, as modificações na borda em escova dos osteoclastos. Os autores concluíram, baseados nos resultados favoráveis obtidos, que o alendronato deveria ser considerado como uma opção de tratamento em situações onde se necessita a existência de neoformação óssea.

Jaime et al.⁵⁵ (2005) avaliaram o efeito tópico do alendronato (20mg/mL), aplicado embebido em uma esponja de colágeno, sobre a reparação óssea de defeitos cirúrgicos de 8mm de diâmetro realizados na calvária de ratas ovariectomizadas. Os defeitos ósseos foram avaliados histológica e histomorfometricamente, após trinta dias da realização da cirurgia óssea. Os autores concluíram que não houve diferença significativa com relação à formação óssea entre o grupo medicado, o grupo tratado com solução fisiológica embebida na esponja cirúrgica e o grupo não ovariectomizado, demonstrando que a ovariectomia e o alendronato tópico não influenciaram o reparo ósseo nas calotas cranianas murinas.

Fernandes³⁵ (2005) estudou a ação local do alendronato sódico, da hidroxiapatita e da associação alendronato - hidroxiapatita no reparo ósseo de fêmures de ratos de ambos os gêneros. Defeitos ósseos de 2,5mm de diâmetro foram confeccionados nos fêmures de 168 ratos, os quais foram divididos em grupos de acordo com o material de preenchimento utilizado: controle (sem preenchimento), amido, alendronato 1M, alendronato 2M, hidroxiapatita 1M, hidroxiapatita 2M e alendronato mais hidroxiapatita. O exame histomorfológico demonstrou, nos grupos sacrificados após sete dias, neoformação óssea com trabéculas imaturas em todos os grupos estudados, exceto nos animais machos tratados com alendronato. Aos 21 dias, os defeitos estavam praticamente fechados na maioria dos espécimes analisados. Houve diferenças estatísticas entre os gêneros e em relação ao uso do alendronato. O autor concluiu que a reparação óssea foi maior nas fêmeas independentemente do período estudado e, também, que o alendronato sódico não contribuiu para a reparação óssea.

Menezes et al.⁸⁰ (2005) estudaram o efeito do alendronato na periodontite experimental induzida em ratos submetidos à ligadura ao redor da coroa dentária dos segundos molares superiores. Os animais foram tratados com alendronato, por via subcutânea, iniciando uma hora antes ou cinco dias após a indução da periodontite e diariamente até a data do sacrifício (após 11 dias). A perda óssea alveolar foi medida pela diferença entre o ápice da cúspide dentária e o osso alveolar. Os autores avaliaram histologicamente o tecido periodontal e a microbiota gengival foi coletada e semeada em meios de cultura para microrganismos aeróbicos e anaeróbicos. Concluiu-se que a perda óssea foi significativamente inibida pelo alendronato nos dois protocolos estudados. O alendronato, segundo os autores, reduziu a lesão tecidual no periodonto, apresentando ainda atividade antibacteriana nesse modelo de periodontite experimental.

Miyaji et al.⁸³ (2005) avaliaram a capacidade da administração sistêmica do alendronato em inibir a reabsorção óssea na interface existente entre osso e parafuso implantado em fêmures de ratos. Os autores constataram, que o tratamento com alendronato reduziu a extensão da membrana fibrosa e o número de osteoclastos na interface parafuso-osso, indicando a existência de um efeito inibitório na reabsorção óssea local.

Moreira et al.⁸⁶ (2005) testaram *in vitro* e *in vivo* a biocompatibilidade de uma pasta de alendronato sódico em polietilenoglicol (2g/mL) para uma possível aplicação clínica posterior em dentes avulsionados por traumatismos e que, após reimplantados, podem sofrer reabsorção radicular. Na análise *in vitro*, a pasta foi colocada em contato com uma cultura de células epiteliais de crescimento confluyente. O alendronato causou marcante decréscimo na porcentagem da viabilidade celular após seis e doze horas, quando comparado ao grupo controle (sem alendronato). Para o estudo *in vivo*, a pasta foi introduzida em tubos de polietileno, que foram implantados no tecido subcutâneo dorsal de seis ratos. Após 14 dias da implantação, os animais foram sacrificados e os cortes histológicos exibiram necrose em extensa área a partir da extremidade aberta do tubo, micro-abscessos e resposta inflamatória com células mononucleares infiltrando a hipoderme e separando também as fibras musculares adjacentes. Conclui-se que a pasta de alendronato, nas condições aplicadas, mostrou-se citotóxica *in vitro* e *in vivo*. Os autores sugeriram novas pesquisas no intuito de se encontrar uma concentração, que seja capaz de inibir a atividade osteoclástica sem causar efeitos indesejáveis, como a necrose tecidual, para uma possível aplicação da pasta em casos de reimplantes dentários.

Reddy & Kumar⁹⁶ (2005) formularam um gel com alendronato e o avaliaram no tratamento de lesões ósseas decorrentes de periodontite em pacientes por seis meses. Os resultados revelaram uma melhora significativa nos parâmetros clínicos estudados (índice gengival, profundidade de bolsa periodontal e nível de inserção clínico), um potente efeito inibitório sobre a reabsorção óssea devido a inibição da atividade de osteoclastos e um aumento na formação óssea local.

Lustosa-Pereira et al.⁷³ (2006) testaram o alendronato como uma substância para tratamento tópico da superfície radicular de dentes avulsionados, na tentativa de prevenir a reabsorção dentária. Incisivos centrais superiores de ratos (n=54) foram extraídos, mantidos secos (período extra-alveolar) por trinta ou sessenta minutos; depois imersos em solução de hipoclorito de sódio 1% por trinta minutos para a remoção do ligamento periodontal e, finalmente, tratados na superfície radicular com alendronato (3,2 mg/L) por dez minutos. Os dentes tiveram os canais preenchidos com hidróxido de cálcio e foram, então, reimplantados. Os resultados indicaram redução na incidência de reabsorção radicular sobre a ação do alendronato, mas nenhum efeito da droga em relação a ocorrência de anquilose dental. Os autores concluíram, também, que não houve diferenças significativas quando se variou o período extra-alveolar de estudo.

2.4 Hidroxiapatita

A procura de um substituto apropriado para o tecido ósseo existe desde que se iniciaram as cirurgias em osso. Desde a década de vinte, muita atenção foi direcionada para os derivados do fosfato de cálcio, como a hidroxiapatita, e nessa classe de compostos

químicos existe uma enorme diversidade de variações químicas e estruturais. A hidroxiapatita é o principal componente mineral dos ossos e dentes e é o fosfato de cálcio que apresenta maior investigação científica e uso clínico. As hidroxiapatitas formam uma larga classe de compostos que compartilham muitas características, como a estrutura química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e excelente biocompatibilidade. Estudos de biocompatibilidade com implantes de hidroxiapatita apresentaram mínima ou nenhuma resposta inflamatória, sem resposta tipo corpo estranho e reação de células gigantes. Não há evidências de toxicidade local ou sistêmica e, isso se deve, em parte, ao fato que os únicos metabólitos da hidroxiapatita são íons cálcio e íons fosfato (HAVLIK⁵¹, 2002).

Análises químicas mostraram que as apatitas biológicas (esmalte, dentina e osso) não são hidroxiapatitas puras, mas contêm outros íons incluindo CO_3 , HPO_4 , F, Cl, Mg, Na, K e algum traço de Zn e Sr, o que determinaria uma fórmula aproximada de $(\text{CaX})_{10}(\text{PO}_4\text{HPO}_4\text{CO}_3)_6(\text{OH Y})_2$, 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 (LEGEROS⁶⁶, 2002).

Biomateriais de fosfato de cálcio diferem na origem (natural ou sintéticos), na composição (hidroxiapatita, beta-tricálcio fosfato e fosfato de cálcio bifásico) ou na forma física de apresentação (partículas, blocos, cimentos, coberturas de implantes metálicos, compósitos com polímeros) e nas propriedades físico-químicas. Esses biomateriais apresentam outras propriedades importantes como a similaridade com o mineral ósseo, bioatividade (habilidade de formar material semelhante à apatita óssea na sua superfície), habilidade de promover funções celulares que conduzem a formação de uma única e forte interface osso-biomaterial, e a osteocondução (habilidade de fornecer um apropriado suporte ou molde para a formação óssea) (LEGEROS⁶⁶, 2002).

A hidroxiapatita apresenta intensa e diversa aplicação ortopédica e odontológica, como no reparo de defeitos ósseos, na manutenção ou aumento da crista alveolar, e no revestimento de implantes dentários e ortopédicos.

Mehlich et al.⁷⁹ (1988) realizaram aumento de rebordo alveolar em 77 pacientes edêntulos, utilizando implantes de colágeno fibrilar purificado combinado com hidroxiapatita densa. Os autores constataram que a altura média do rebordo alveolar era de 15,3mm antes da cirurgia e 19,5mm depois de um ano, com um aumento final de 4,2mm. Mehlich et al.⁷⁸ (1989) detectaram após dois anos da cirurgia, nesses pacientes operados, um aumento final no rebordo de 4,1mm e a análise histológica, em cinco pacientes, na região da interface osso-enxerto, verificou que as partículas de hidroxiapatita estavam circundadas por tecido conjuntivo denso do hospedeiro e por trabéculas ósseas. Schwartz & Relle¹¹⁵ (1990) também obtiveram aumento significativo em rebordos mandibulares edêntulos utilizando uma técnica em que a hidroxiapatita foi injetada na região.

Collins²¹ (1989) avaliou o desempenho funcional de artefatos tubulares constituídos por colágeno bovino e preenchidos com hidroxiapatita utilizados em cirurgias para aumento de maxila edêntulas, em 12 pacientes. Em todos os casos, o autor relatou aumento na capacidade mastigatória e conforto com o uso de próteses totais, não havendo migração de partículas ou perda de altura vestibular do rebordo. Com a mesma intenção de provocar aumento em altura do rebordo maxilar, Artzi et al.⁵ (2001) avaliaram, em dez pacientes, quantitativa e qualitativamente duas diferentes hidroxiapatitas, uma derivada do osso bovino e outra sintética. Os resultados mostraram evidente formação óssea e que ambos tipos de hidroxiapatita foram biocompatíveis, mas os

sítios que receberam hidroxiapatita bovina mostraram-se com maior neoformação óssea.

Hallman & Zetterqvist⁴⁹ (2004) avaliaram o desempenho clínico, em vinte pacientes, de implantes de titânio inseridos na maxila após seis meses da realização do aumento do rebordo alveolar com uma mistura de 80:20 de hidroxiapatita bovina e osso autógeno mandibular, através do estudo clínico e radiográfico. Após cinco anos, 15 dos 108 implantes não resistiram às cargas funcionais impostas as próteses fixas suportadas pelos implantes. Os autores concluíram que a mistura hidroxiapatita e osso autógeno pode ser usada como material para enxertos ósseos com poucas complicações e com resultados, a longo prazo, aceitáveis.

Singh et al.¹²¹ (2004) descreveram um estudo sobre o acompanhamento, por dez anos, de 33 pacientes com menos de cinquenta anos, que apresentavam distúrbios ósseos (como a 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.

Diversos estudos, em animais e em cultura de células, têm abordado a ação da hidroxiapatita e da sua associação com outros materiais envolvendo reparação de defeitos ósseos cirúrgicos e revestimentos de implantes dentários, sendo estes descritos a seguir.

Alper et al.² (1989) avaliaram o efeito da hidroxiapatita derivada de corais, da matriz óssea desmineralizada e da combinação de ambas substâncias no reparo ósseo de um defeito cirúrgico de 5mm em tibia de ratos com dez meses de idade. A região do defeito ósseo foi avaliada por análises histológicas, radiográfica e bioquímica (quantificação de fosfatase alcalina e incorporação de ⁴⁵Cálcio). O grupo que recebeu hidroxiapatita apresentou diminuição na formação óssea, com o defeito preenchido por cristais de hidroxiapatita encapsuladas por tecido conjuntivo fibroso. Os resultados bioquímicos mostraram aumento de 16% na formação óssea no grupo tratado com matriz óssea desmineralizada e redução de 80% nos grupos com hidroxiapatita sozinha e combinada. Os autores concluíram que a hidroxiapatita prejudicou a neoformação óssea.

Baslé et al.⁸ (1993) avaliaram a ação de cerâmicas de hidroxiapatita sobre o reparo ósseo em coelhos, sendo uma com origem a partir de tecido ósseo bovino e a outra uma mistura de hidroxiapatita natural e tricálcio fosfato. Após sete dias da implantação, células osteoblásticas foram encontradas sobre finas camadas de osso neoformado presentes nas lacunas internas de ambos biomateriais. A reabsorção dos biomateriais envolveu dois tipos celulares: células gigantes multinucleares fosfatase ácida tartarato resistentes negativas e sem borda ondulada, que predominaram nas primeiras duas semanas, e osteoclastos (células gigantes multinucleares fosfatase ácida tartarato resistentes positivas), que apresentavam zona clara e borda ondulada identificadas pela microscopia eletrônica. Com ambos materiais, os autores encontraram neoformação óssea e a reabsorção dos biomateriais, mas destacaram que com a hidroxiapatita bovina a formação óssea foi mais rápida, sugerindo um melhor suporte para a atividade osteoblástica desse biomaterial.

Carvalho et al.¹⁸ (1993) estudaram o efeito de duas marcas comerciais (HA-40 e Osteosynt) de hidroxiapatita sintética no reparo ósseo de defeito realizado em tibia de ratos, através da análise histológica após trinta e sessenta dias da colocação dos materiais analisados. Os resultados obtidos no trabalho demonstraram que o tecido neoformado no grupo Osteosynt era mais organizado e compacto após 30 e 60 dias, e que o osso neoformado contornava o material em íntimo contato. Os autores observaram que não houve absorção da hidroxiapatita implantada e justificaram esse fato baseado nas dimensões das partículas utilizadas.

Rosa et al.¹⁰⁴ (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 micropartículas e foram envolvidos rapidamente pelo tecido conjuntivo durante o processo de reparo.

Bárbara et al.⁷ (1997) apresentaram uma revisão de literatura sobre o emprego de implantes dentais com cobertura de hidroxiapatita. Os autores destacaram que esses tipos de implantes apresentavam superfícies bioativas, com a presença de material biocompatível aumentando ou estimulando a formação de novo tecido e, no caso específico de implantes orais, promovendo a união do osso ao

implante. O uso de implantes cobertos por hidroxiapatita introduziu um novo tipo de interface, onde se observou uma união química do osso e da superfície do implante, além da retenção mecânica obtida pela proximidade do osso com o implante. Esses implantes foram 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 se apresentou como 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.

Lew et al.⁶⁷ (1997) avaliaram a evolução do reparo ósseo craniofacial em calvárias caninas preenchidas por cimento de hidroxiapatita acrescido ou não de osso desmineralizado na forma de pó. O cimento de hidroxiapatita formou um efetivo suporte para a neoformação óssea, mas, ao contrário do esperado, a adição de osso desmineralizado não resultou em formação de maior quantidade de tecido ósseo. Os autores sugeriram que os grânulos da hidroxiapatita bloquearam a osteogênese induzida pelo osso desmineralizado.

Luklinska & Bonfield⁷² (1997) examinaram, através da microscopia eletrônica de varredura e da microscopia eletrônica de transmissão, a interface osso e implante de compósito de polímeros polihidroxibutirato (PHB) acrescentado de partículas de hidroxiapatita sintética. Após seis meses de implantação em coelhos, os autores explicaram que o mecanismo de união do osso ao implante só foi possível pela degradação da matriz do PHB, o que guiou a formação de novos cristalitos entre as partículas de hidroxiapatita do composto. Essa neoformação de cristalitos indicou, segundo os autores, a bioatividade desse compósito *in vivo*.

Di Silvio et al.²⁶ (1998) realizaram estudos bioquímicos e histológicos, *in vitro*, sobre o efeito do compósito de polietileno de alta densidade reforçado com 20% ou 40% de volume em hidroxiapatita. Nesse estudo, a cultura com o compósito a 20% exibiu uma grande taxa de proliferação de osteoblastos quando comparado com a concentração a 40%. Além disso, em ambos casos os osteoblastos se mostravam sobre os compósitos sendo essa característica mais marcante com o compósito a 20%. Esse estudo mostrou que os biomateriais não são idênticos quanto a bioatividade e que estudos precisam ser realizados para avaliar a resposta biológica desses compostos.

Rosa et al.¹⁰⁵ (1998) avaliaram o comportamento histológico de três diferentes tipos de hidroxiapatita implantadas bilateralmente em arco zigomático de ratos, sendo estas representadas por Osteogen, hidroxiapatita experimental federal (HFA) e Interpore 200. Os autores constataram que em todas condições experimentais houve seqüência reparativa com formação de osso novo, no decorrer do estudo, com retardo bem evidenciado nos três grupos, quando comparado com o grupo controle. Percebeu-se também, uma constante presença de atividade macrófaga, sendo exercida por fagócitos mononucleares e por células gigantes, sobre os materiais até o final do experimento.

Salata et al.¹¹⁰ (1998) realizaram um estudo comparativo sobre a ação da hidroxiapatita e de um substituto ósseo ionomérico sobre o reparo ósseo em mandíbulas de ratos associado ou não com a técnica de regeneração óssea guiada, através da análise histomorfométrica. Os defeitos que receberam o implante do substituto ósseo ionomérico demonstraram maior formação óssea que todos os outros grupos. O uso da técnica guiada não aumentou a quantidade de osso formado, quando comparado com o uso apenas dos substitutos ósseos. A hidroxiapatita e o substituto ionomérico usados isoladamente foram mais efetivos na

indução da reparação, que o uso apenas da membrana sem material de enxerto. Em relação a resposta inflamatória, os autores observaram uma resposta mais intensa com a hidroxiapatita.

Boeck et al.¹³ (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.

Chistolini et al.²⁰ (1999) avaliaram as propriedades mecânicas de implantes de hidroxiapatita repletos de células do estroma da medula óssea ou livres de células (controle), após a colocação dos mesmos em tíbias de ovelhas. Após oito semanas, tecido ósseo foi encontrado no interior dos macroporos dos implantes de hidroxiapatita preenchido por células, mas, nos implantes controle, a formação óssea foi limitada à superfície externa. A dureza do implante com células foi avaliada entre as durezas de uma placa de hidroxiapatita e do osso tíbia, sendo os implantes preenchidos com células mais resistentes que aqueles sem células.

Souza et al.¹²³ (1999) realizaram a análise do efeito da hidroxiapatita em pó, inoculada subcutaneamente após incisão cirúrgica, no reparo da ferida e sobre a população de mastócitos teciduais. Os autores detectaram que a hidroxiapatita em pó não interferiu no processo de reparo por cicatrização, mas suscitou uma reação inflamatória tipo corpo estranho. As populações de mastócitos observadas no tecido subcutâneo, localizadas na área incisada e na área adjacente, não

apresentaram alterações morfológicas sob a influência da hidroxiapatita em pó, mas houve aumento estatisticamente significativo no número médio de mastócitos no grupo experimental de trinta dias, quando comparado com o controle.

Dalkyz et al.²⁵ (2000) analisaram histologicamente o reparo de defeitos ósseos em tibia de coelho, preenchidos com coral, com osso desidratado, com hidroxiapatita ou com hidróxido de cálcio, por sete, 15, trinta, 45 e sessenta dias após a cirurgia. Embora, todos materiais tivessem apresentado boa remodelação óssea no final dos sessenta dias, o coral e a hidroxiapatita foram ainda encontrados na área do reparo durante todo o período de estudo. O osso desidratado e o hidróxido de cálcio foram os mais efetivos na reparação óssea. Os autores concluíram que o hidróxido de cálcio foi um material com grande potencial de uso no reparo de defeitos ósseos.

Figueiredo et al.³⁷ (2001) estudaram a integração da hidroxiapatita porosa de coral em forma de cerâmica, como alternativa biológica para substituir enxertos ósseos autógenos, em 42 coelhos submetidos a defeitos ósseos em côndilos femorais. A análise histológica, após 12 semanas, demonstrou a presença de tecido ósseo maduro mais precocemente no grupo controle (sem material de preenchimento do defeito), que no grupo tratado com a hidroxiapatita. Os autores perceberam, também, a presença de cavidades apenas nos implantes de hidroxiapatita, sendo estas resultantes da atividade osteoclástica na região entre implante e osso receptor.

Sabokbar et al.¹⁰⁸ (2001) estudaram se detritos liberados de biomateriais de implantes, como partículas de hidroxiapatita e polimetilmetacrilato (PMMA), poderiam produzir a diferenciação de macrófago em osteoclastos e, conseqüentemente, osteólise. Macrófagos,

isolados de granulomas induzidos por injeção subcutânea com hidroxiapatita ou PMMA, cresceram em cultura com uma linhagem de osteoblastos e na presença de 1,25 dihidroxivitamina D₃, sobre fatias de osso. Nos dois casos, evidenciou-se a diferenciação de macrófagos em osteoclastos e a formação de lacunas de reabsorção nas fatias ósseas, sendo que esse fato foi significativamente menor com a hidroxiapatita que com o PMMA.

Yoshinari et al.¹⁴⁶ (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 bisfosfonato (pamidronato) retido 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 implante 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.

Brandão et al.¹⁴ (2002) estudaram, em ratos, o efeito isolado da hidroxiapatita e da sua associação com proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) sobre a reparação óssea nos alvéolos após extrações dentárias. Os materiais implantados produziram um retardo na cronologia do reparo alveolar avaliado histológica e histomorfometricamente, em comparação ao grupo controle (grupo sem material introduzido nos alvéolos). Os grânulos absorvíveis de hidroxiapatita usados como veículo para BMPs foram associados com um infiltrado inflamatório mais intenso quando comparado com os sítios tratados com hidroxiapatita não absorvível e sem BMPs. Os autores

concluíram que os materiais não trouxeram benefícios à formação óssea no período estudado da reparação alveolar.

Fernandes³⁴ (2002) avaliou a ação do alendronato e a sua associação com hidroxiapatita pura granular na reparação de defeitos ósseos nos corpos mandibulares de coelhos. O primeiro grupo de animais recebeu, por via oral, 1mg/Kg/dia de alendronato durante dez dias após a cirurgia. No outro, além do tratamento com alendronato oral, realizou-se o preenchimento do defeito com a hidroxiapatita. Na análise histológica dos dois grupos após 14 dias revelou-se neoformação óssea que fechava o defeito em extensão e, em 21 e 28 dias, observou-se maturação das trabéculas ósseas e diminuição dos espaços medulares. No segundo grupo, as partículas de hidroxiapatita permaneceram interpostas ao osso neoformado no interior do defeito. Na análise histomorfométrica, o autor não detectou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos, concluindo que o alendronato e a sua associação com a hidroxiapatita não interferiram na reparação óssea.

Ganguli et al.⁴² (2002) mostraram a preocupação existente com a perda asséptica de implantes devido a osteólise em resposta às pressões estressantes ou por 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 e clodronato, em solução e como cobertura da hidroxiapatita, foram investigados sobre os osteoblastos *in vitro*. Pamidronato inibiu a síntese de colágeno quando em solução, mas não depois de ligado a hidroxiapatita. Quando ligados à hidroxiapatita, pamidronato e clodronato aumentaram a síntese de DNA e de colágeno por osteoblastos o que poderia favorecer a osteointegração dos implantes. Os autores sugeriram novos estudos averiguando se os

efeitos inibitórios dos bisfosfonatos sobre osteoclastos e macrófagos continuam mesmo após a ligação com a hidroxiapatita.

Mochida et al.⁸⁴ (2002) inseriram próteses de titânio recoberto com hidroxiapatita, após a remoção da cabeça de fêmur, em 12 cachorros, sendo que metade destes receberam, por via oral, alendronato (10mg/dia). Não houve diferença nos achados radiográficos ou histológicos entre ambos grupos após quatro ou 24 semanas. Os autores não identificaram ação do alendronato sobre os ossos cortical ou esponjoso ao redor da área dos implantes, nem na aposição óssea sobre as partículas de hidroxiapatita, e concluíram que o medicamento não afetou a fixação inicial protética e a remodelação óssea ao redor da prótese femoral.

Braz et al.¹⁶ (2003) avaliaram a reparação óssea em defeitos produzidos em crânios de vinte ratos frente a combinação de matriz óssea orgânica e hidroxiapatita. Quando utilizadas de maneira isolada tanto a hidroxiapatita, como a matriz óssea desmineralizada, mostraram efeito positivo na reparação óssea. Fato semelhante foi observado no grupo da associação entre os materiais, uma vez que, histologicamente, já havia presença de cartilagem aos trinta dias e início do processo de mineralização óssea aos sessenta dias de pós-operatório. A combinação matriz óssea bovina e hidroxiapatita não causou reações adversas e favoreceu a reparação óssea, segundo os autores.

Moreira et al.⁸⁵ (2003) avaliaram a integração óssea de partículas de hidroxiapatita (Gen-phos, Baumer) de diferentes tamanhos (0,21mm, 0,5mm e 1mm) no interior de defeitos ósseos produzidos em fêmures de ratas, através da análise radiológica e histológica, concentrando-se na interface tecido ósseo-hidroxiapatita. Os autores perceberam que os grânulos utilizados para o preenchimento foram

biocompatíveis e a reparação óssea ocorreu mais rapidamente nas falhas ósseas preenchidas com grânulos de menor diâmetro (0,21mm).

Ferreira et al.³⁶ (2004) avaliaram a capacidade de proteínas morfogenéticas bovinas (BMPs) ligadas a hidroxiapatita sintética absorvível microgranular em estimular a reparação óssea em defeitos de 8mm de diâmetro, em ossos do crânio de 25 ratos. Os resultados morfométricos, obtidos a partir de imagens radiográficas, apresentaram ausência de formação óssea nos períodos de um a três meses e, histologicamente, os defeitos estavam preenchidos por tecido fibroso e inúmeros focos de reação granulomatosa tipo corpo estranho, ao redor das partículas aglomeradas de hidroxiapatita. Ao final de seis meses, a reação granulomatosa diminuiu e 22% das áreas dos defeitos diminuíram como observado no grupo controle. Os autores concluíram que as substâncias associadas no tratamento dos defeitos ósseos cranianos promoveram a formação de reação granulomatosa, inibindo a neoformação óssea e sugeriram que a hidroxiapatita microgranular não foi boa carreadora para as BMPs.

Tieliewuhan et al.¹³² (2004) desenvolveram um novo biomaterial a base de CO₃-apatita sintética misturado 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 sugeriram o uso terapêutico desse biomaterial como substituto ósseo.

Xie et al.¹⁴⁰ (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 sugeriram que um grupo de genes responsivos para a hidroxiapatita deve contribuir para a diferenciação de osteoblastos.

Costa et al.²² (2005) compararam a neoformação óssea ao redor de implantes rosqueáveis fabricados em titânio puro ou recobertos com hidroxiapatita inseridos em tíbias de coelho por períodos de oito ou 12 semanas. A análise histomorfométrica, em imagens de microscopia eletrônica de varredura, demonstrou melhor desempenho com os implantes recobertos em relação a área de contato osso-implante. A comparação da quantidade de osso no interior das roscas não mostrou diferença significativa entre os dois tipos de implantes.

Kim et al.⁶² (2005) desenvolveram uma hidroxiapatita porosa coberta pelas 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 com revestimento de antibiótico 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 nos casos de reparação óssea pela facilidade da liberação do antibiótico.

Kurth et al.⁶⁵ (2005) utilizaram 84 ratas ovariectomizadas, que receberam nos fêmures implantes de titânio puro ou coberto com hidroxiapatita e foram medicadas diariamente com um aminobisfosfonato (ibandronato), por via subcutânea. Após quatro semanas, a densidade mineral óssea da coluna vertebral das ratas medicadas aumentou, quando comparada a do grupo ovariectomizado não medicado, e ficou em níveis similares a do grupo controle (não ovariectomizado, nem medicado). A osteointegração dos implantes foi maior com os implantes recobertos com a hidroxiapatita no grupo medicado com o ibandronato. No grupo não medicado e ovariectomizado, que recebeu os implantes com revestimento, a osteointegração foi 56% menor que nas ratas não ovariectomizadas. Os autores concluíram que a osteopenia induzida pela ovariectomia prejudicou a osteointegração dos implantes recobertos com hidroxiapatita e que o ibandronato reverteu esse efeito nocivo no grupo medicado.

Li et al.⁶⁹ (2005) desenvolveram um compósito de hidroxiapatita e quitosano, um polímero biodegradável natural. Analisou-se a microestrutura do material e a sua capacidade em ser biodegradável e bioativo, quando em contato com uma solução de concentração iônica definida. Os autores descobriram que os cristais de hidroxiapatita alinhavam-se entre as fibras do quitosano e que a relação 30/70 de quitosano e hidroxiapatita, respectivamente, foi a que demonstrou maior resistência à compressão (120MPa). No interior do compósito, o conteúdo de quitosano foi reduzido pela sua natural degradação, expondo os cristais de hidroxiapatita, que tenderam a aumentar pelo depósito de cálcio, pois a concentração desse íon diminuiu, com o passar do tempo, na solução iônica analisada. Os autores concluíram, então, que o compósito foi bioativo pela indução do depósito superficial de apatitas semelhantes às do tecido ósseo.

Simon et al.¹²⁰ (2005) analisaram a biocompatibilidade de cinco tipos de implantes de titânio com as superfícies modificadas: titânio poroso, titânio “jateado”, titânio revestido com hidroxiapatita, titânio tratado com jato de ácido nítrico e titânio coberto com hidroxiapatita e tratado com ácido. A biocompatibilidade foi analisada *in vitro*, utilizando uma cultura de osteoblastos, onde se avaliou morfologia, aderência e proliferação celulares. Todas as superfícies tratadas influenciaram os três parâmetros celulares avaliados, mas houve um aumento significativo na atividade osteoblástica no grupo com titânio poroso. Os autores observaram que, após sete dias de cultura, os implantes com hidroxiapatita demonstravam as menores taxas de proliferação celular superficial.

Thorwarth et al.¹³¹ (2005) examinaram a neoformação em defeitos ósseos preenchidos com osso autógeno ou com hidroxiapatita particulada ou com a combinação dessa hidroxiapatita mais 25% de osso autógeno, em porcos, por até seis meses após a cirurgia. Análises radiográficas e histológicas indicaram taxas de neoformação não diferentes estatisticamente entre os três grupos estudados. Os autores sugeriram que a hidroxiapatita particulada possuía as características esperadas para um substituto ósseo.

Yao et al.¹⁴⁴ (2005) avaliaram um método que utilizava polimetil metacrilato (PMMA) na produção da porosidade controlada em cerâmicas de hidroxiapatita. Nesse método, o pó de hidroxiapatita foi misturado com partículas de PMMA e aquecido a 550⁰C, por 72h, para a queima do PMMA e, após, foi realizado o tratamento da hidroxiapatita a 1200⁰C, por 2h. A porosidade das cerâmicas de hidroxiapatita pôde ser controlada pela alteração no tamanho e no conteúdo de PMMA. Os autores concluíram que esse tipo de cerâmica possuía maior resistência que a cerâmica produzida por prensagem.

3 PROPOSIÇÃO

Estudar a ação local do alendronato sódico, da hidroxiapatita e da associação alendronato mais a hidroxiapatita na reparação de defeitos cirúrgicos realizados em fêmures de ratas ovariectomizadas.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

A realização desta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob protocolo de número 009/2005 – PA/CEP (Anexo A) e realizada de acordo com 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.

Neste estudo, foram utilizadas 98 ratas (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar) pesando em média duzentos e cinquenta gramas (HARKNESS & WAGNER⁵⁰, 1993) e com, aproximadamente, três meses de idade. 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, a temperatura ambiente, e alimentados com ração e água *ad libitum*.

4.2 Divisão dos grupos

Os 98 animais foram divididos em sete grupos constituídos por 14 animais cada. Os grupos experimentais foram: grupo controle (C), grupo amido (Am), grupo alendronato - 1mol (A1), grupo alendronato - 2moles (A2), grupo hidroxiapatita - 1mol (HA1), grupo

hidroxiapatita - 2moles (HA2) e grupo alendronato + hidroxiapatita – 1mol + 1mol (A+HA) (Quadro 1).

Quadro 1 - Grupos experimentais

Grupos experimentais	Número de animais
Controle (C)	14
Amido (Am)	14
Alendronato - 1mol (A1)	14
Alendronato - 2moles (A2)	14
Hidroxiapatita - 1mol (HA1)	14
Hidroxiapatita - 2moles (HA2)	14
Alendronato + hidroxiapatita – 1mol + 1 mol (A+HA)	14
Total	98

Todos os animais foram submetidos a duas cirurgias. Foi realizada primeiramente a ovariectomia quando as ratas atingiram o peso médio de 250g e, após trinta dias, confeccionou-se o defeito ósseo no fêmur. Somente no grupo C, o defeito ósseo não recebeu material, ficando apenas preenchido pelo coágulo sangüíneo proveniente da própria ferida óssea. Nos demais grupos, os defeitos ósseos foram preenchidos pelos materiais em proporções indicadas no Quadro 2. O defeito do grupo Am foi preenchido somente pelo excipiente (amido).

Quadro 2 - Proporção (%) de material no interior do defeito ósseo

Material de preenchimento	% de material	% de excipiente (amido)	% total
HA – 2moles HA2	100% 12,44g	0%	100%
HA – 1mol HA1	50% 6,22g	50% 6,22g	100%
A – 2moles A2	52% 6,5g	48% 5,94g	100%
A – 1mol A1	26% 3,25g	74% 9,19g	100%
A+ HA - 1mol + 1mol	26%+ 50% = 76% 3,25g + 6,22g	24% 2,97g	100%

Todos os grupos experimentais foram divididos em dois subgrupos, constituídos por sete animais cada, conforme os períodos de observação de sete ou 21 dias após a cirurgia, sendo que os animais foram sacrificados após esses períodos (Quadro 3).

Quadro 3 - Divisão dos animais dos grupos experimentais em subgrupos, conforme o tempo de observação, em dias, e a quantidade de animais sacrificados por período

Grupos experimentais	Tempo de observação (dias)		Animais sacrificados/ período
	7	21	
Controle (C)	7	21	7
Amido (Am)	7	21	7
Alendronato 1mol - (A1)	7	21	7
Alendronato 2moles - (A2)	7	21	7
Hidroxiapatita 1mol - (HA1)	7	21	7
Hidroxiapatita 2moles - (HA2)	7	21	7
Alendronato + hidroxiapatita 1mol + 1mol - (A+HA)	7	21	7

4.3 Materiais utilizados

Os materiais avaliados quanto ao efeito sobre a reparação óssea foram o alendronato sódico (Farmácia Bandeirantes, Araraquara, São Paulo) e a hidroxiapatita microgranular absorvível (Gen-phos, Baumer S.A.). A hidroxiapatita apresentava partículas de tamanho entre 0,25 -1,00mm esterilizadas por radiação gama e estava indicada para uso em cavidades cirúrgicas. O amido de milho foi o excipiente utilizado, pois é considerado inerte e serviu apenas para completar as dosagens necessárias dos outros dois materiais no momento da manipulação dos mesmos. O amido e o alendronato sódico foram cedidos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas do câmpus de Araraquara – UNESP.

O cálculo da quantidade dos materiais foi realizado baseado no peso molecular das substâncias utilizadas. A hidroxiapatita

tem peso molecular de 622g sendo este maior que o do alendronato, (325,12g). Quando os dois materiais foram associados (grupo A+HA – 1mol + 1mol), esperava-se a existência, no interior do defeito ósseo, da mesma quantidade de moléculas das duas substâncias e, para tal, preferiu-se trabalhar com os pesos moleculares e moles destas, ou seja, 1mol de alendronato e 1mol de hidroxiapatita.

As quantidades em gramas dos materiais foram calculadas baseadas em 0,01mol de cada substância. Então, baseado no grupo HA2, determinou-se as quantidades de substâncias e do excipiente (no caso, o amido) de todos os grupos. Usou-se 12,44g de hidroxiapatita no grupo HA2. Assim, nos demais grupos, a partir desse parâmetro, completou-se com o amido até que se atingisse o valor final de 12,44g. Assim, no grupo HA1 houve 6,22g de hidroxiapatita e 6,22g de amido (correspondendo a 50% de Hidroxiapatita); no grupo A1, 3,35g de alendronato e 9,19g de amido (correspondendo a 26% de alendronato); no grupo A2, 6,5g de alendronato e 5,95 de amido (sendo aproximadamente 52% de alendronato); na associação A+HA, 6,22g de hidroxiapatita e 3,25g de alendronato e 2,97g de amido, correspondendo a 76% das duas substâncias no interior do defeito (Quadro 2). Como utilizamos o amido como excipiente, criou-se um grupo experimental (grupo Am) que utilizou apenas o amido para preencher o defeito ósseo, para pesquisar, dessa forma, se o amido interferiu na reparação das cavidades e na ação do alendronato e da hidroxiapatita (FERNANDES³⁵, 2005)

O alendronato e a hidroxiapatita precisavam ser misturados isolados ou em conjunto com o amido. Cada material foi pesado anteriormente em balança de precisão (AB 204, Metter Toledo), tomando-se o cuidado para não contaminá-los, e mantidos em frascos esterilizados selados até o momento do uso. No momento da utilização dos materiais, cada um foi introduzido em um saco plástico limpo, que foi

vigorosamente manipulado, o que permitiu a mistura homogênea de todos os elementos (FERNANDES³⁵, 2005).

4.4 Procedimentos cirúrgicos

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados numa sala cirúrgica cuidadosamente limpa e preparada para tal, no Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos – UNESP, sob iluminação artificial adequada e com aparelho sugador. No momento da cirurgia, o operador e o auxiliar estavam devidamente paramentados com avental, gorro, máscara e luvas de procedimento e todo o instrumental e campos cirúrgicos foram esterilizados em autoclave.

As ratas foram pesadas para o cálculo da dosagem ideal do anestésico administrado para cada animal. Em todas as cirurgias, utilizou-se para anestesia uma solução aquosa de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina a 2% (Rompun, Bayer do Brasil), uma substância sedativa analgésica e relaxante muscular, e o cloridrato de ketamina (Dopalen, Vetbrands), um anestésico geral, na proporção de 1,0ml para 0,5ml, respectivamente. A dose aplicada da solução foi de 0,1ml para cada 100g de peso do animal, sendo injetada por via intramuscular, utilizando-se de agulha e seringa descartáveis.

4.4.1 Ovariectomia

Depois de anestesiadas, as ratas foram posicionadas lateralmente, o que permitiu a visualização e fácil acesso aos seus flancos laterais. Após a tricotomia e a anti-sepsia da área com solução aquosa de polividona com 10% de iodo ativo (Hi-Odin, Halex Istar Ltda.), realizou-se, logo abaixo da última costela e próxima ao nível do rim, uma incisão de 1,5cm na pele e na camada muscular (Figura 1a). O ovário foi identificado e exposto, sendo realizada a hemostasia através da ligação da parte superior da trompa com fio de seda nº 4 (Ethicon, Johnson & Johnson) (Figura 1b). O ovário, a gordura circundante, o oviduto e uma pequena porção do útero foram excisados (Figura 1c). A musculatura foi suturada com fio de sutura reabsorvível nº 4 (Catgut simples, Shalon) e a pele com fio de seda nº 4 (Ethicon, Johnson & Johnson) (Figura 1d). Realizou-se bilateralmente esse procedimento cirúrgico (SILVA¹¹⁸, 2000).

4.4.2 Defeito ósseo

Decorridos trinta dias da ovariectomia, os animais foram novamente anestesiados e, após a tricotomia da região do fêmur esquerdo e a anti-sepsia da pele utilizando uma solução aquosa de polividona com 10% de iodo ativo (Hi-Odin, Halex Istar Ltda.), foi realizada na pele, com uma lâmina nº15 montada em bisturi do tipo Bard & Parker, uma incisão seguindo o sentido do longo eixo do osso e medindo aproximadamente 2,5cm. Realizada a incisão, a pele foi afastada e os músculos da região do terço distal do fêmur esquerdo foram dissecados e afastados com o auxílio de espátula 07 e sindesmótomo, a fim de se expor o osso para a confecção do defeito ósseo (Figura 1e). O perióstio foi afastado delicadamente com uma espátula 07.

A maior extensão látero-medial da diáfise distal do fêmur esquerdo foi a localização exata para o feitiço do defeito ósseo (Figura 1f).

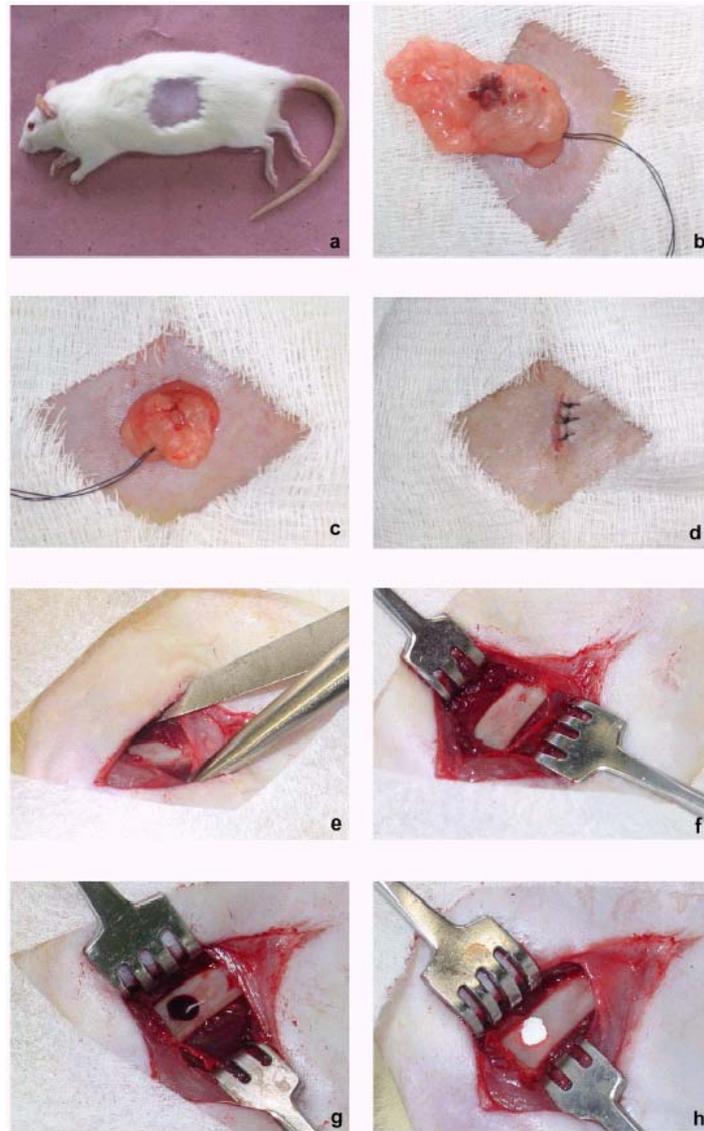


FIGURA 1 – Procedimentos cirúrgicos para a realização da ovariectomia e para a confecção do defeito cirúrgico no fêmur esquerdo; a) região na qual foi feita a incisão longitudinal, iniciada logo abaixo da última costela; b) exposição do ovário e subsequente ligadura na região; c) ovário, parte do útero e tecidos circundantes foram removidos; d) sutura na pele; e) afastamento dos tecidos moles para exposição do fêmur; f) exposição total da região onde foi realizado o defeito ósseo; g) defeito ósseo de 2,5mm de diâmetro já confeccionado; h) inserção do material experimental no defeito ósseo.

O mesmo foi confeccionado utilizando-se uma broca trefina, medindo 2,5mm de diâmetro externo, montada num micromotor (de 20.000 rpm máxima, NSR), sob irrigação com soro fisiológico esterilizado (NaCl à 0,9%) (Figura 1g). A broca foi posicionada perpendicularmente ao longo eixo do fêmur permitindo o corte circular da cortical óssea.

Todos os animais foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, visando a confecção do defeito ósseo, que foi abundantemente lavado com soro fisiológico e seco com auxílio de sugador e com gaze esterilizada. Posteriormente a essa etapa operatória, os defeitos ósseos foram preenchidos pelos materiais respeitando os grupos descritos no Quadro 1. Utilizando-se um porta-amálgama, as substâncias foram inseridas no defeito (Figura 1h) e condensadas com um condensador de amálgama, misturando-se com o sangue proveniente do próprio defeito ósseo (FERNANDES³⁴, 2002; PEREIRA⁹¹, 2004; FERNANDES³⁵, 2005).

Após o preenchimento dos defeitos ósseos, os tecidos moles foram reposicionados e suturados com fio reabsorvível nº4 (Catgut simples, Shalon) e a pele suturada com pontos simples utilizando fio de seda nº4 (Ethincon, Johnson & Johnson) e, por fim, fez-se a assepsia da pele. Na seqüência, foram administrados, aos animais, o antiinflamatório Voltaren IM - 10mg/kg (diclofenaco sódico 75mg/3ml-injetável, Medley) na dose de 0,1ml da solução para cada 100g de peso do animal e o antibiótico Pentabiótico IM (penicilina 24.000UI/kg, estreptomicina e diidroestreptomicina 10mg/Kg), injetando 0,1ml da solução pronta para cada animal. Os medicamentos foram injetados na seqüência e em locais diferentes.

4.5 Sacrifício

Os animais foram sacrificados decorridos sete e 21 dias da data da realização do defeito ósseo. Todos foram anestesiados e decapitados em guilhotina. Os fêmures foram removidos e os tecidos moles excedentes cuidadosamente eliminados. As peças ósseas foram fixadas em uma solução de formol a 10%, e permaneceram armazenadas em frascos, por no mínimo 48h.

4.6 Análise dos resultados

Os fêmures esquerdos, depois de fixados, foram descalcificados em solução aquosa de ácido etilendinetriilo tetra-acético-sal dissódico dihidratado (EDTA) a 10% (Titriplex P.A., Merck-KgaA) e hidróxido de sódio P.A. (Merck-KgaA) a 4%, por cerca de seis meses. Decorrido o período de tempo necessário para a descalcificação, as peças ósseas foram aparadas, seccionadas transversalmente, de modo que uma das extremidades da peça ficasse próxima a borda inferior do defeito ósseo, e preparadas para a inclusão em parafina. Cada fragmento foi incluído em bloco de parafina perpendicularmente à superfície do corte e submetido à técnica histológica de rotina. Os cortes seriados da região do defeito ósseo, com aproximadamente 6µm de espessura, foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE, Merck) (ALMEIDA et al.¹, 2000). No preparo dos cortes semi-seriados foram confeccionadas seis lâminas por animal, sendo que havia, aproximadamente, quatro cortes / lâmina, de tal modo que era uma lâmina para cada nível. Toda a extensão do defeito foi seccionada seqüencialmente, de tal modo que a região central do defeito cirúrgico foi avaliada na terceira ou quarta lâmina.

4.6.1 Análise histológica

As lâminas foram examinadas à microscopia de luz para a análise morfológica dos níveis de reparação óssea. A análise histológica forneceu dados qualitativos sobre o osso neoformado e, assim, foi possível a descrição do tecido ósseo neoformado nos diferentes grupos experimentais e períodos de observação. Foram observadas as trabéculas neoformadas, os vasos sanguíneos neoformados, a reparação na superfície de corte, a presença de espaços medulares, as células do tecido ósseo, bem como a resposta inflamatória diante da implantação local do amido, do alendronato sódico, da hidroxiapatita e da associação alendronato sódico mais hidroxiapatita nos fêmures das ratas (FAYAD³², 2001; FERNANDES³⁵, 2005).

4.6.2 Análise histomorfométrica

Seis cortes dos defeitos ósseos foram avaliados por espécime (lâminas 1, 3 e 5), sendo dois cortes/nível, através da planimetria por contagem de pontos, totalizando seiscentos pontos analisados por animal. Esta análise forneceu dados numéricos sobre a neoformação óssea e estes foram submetidos ao tratamento estatístico. A região do defeito ósseo, em um aumento original de cem vezes, foi analisada em um microscópio de luz Zeiss Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) acoplado a uma câmara digital Cyber Shott modelo DSC-585 (Sony). As imagens foram visualizadas em um monitor de TV, registradas na câmara e transmitidas, posteriormente, para um microcomputador, sendo submetidas à análise histomorfométrica da neoformação óssea. A contagem de pontos neoformados foi realizada com o auxílio do programa Image-J (Versão 1,32 para *Windows*) de domínio público, do Instituto Nacional de Saúde (NIH, Bethesda, EUA), utilizando-se de um retículo quadriculado composto por cem pontos

resultantes das intersecções entre linhas verticais e horizontais, que foi superposto à imagem histológica digitalizada. Foram considerados os pontos do retículo que estavam em sobreposição com o osso neoformado (PEREIRA⁹¹, 2004; FERNANDES³⁵, 2005).

4.7 Análise estatística

Os pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas foram divididos pelo total de pontos existentes (P/600), fornecendo uma idéia da proporção de osso formado preenchendo o defeito ósseo (média proporcional). Todos os dados de cada grupo foram submetidos a um intervalo de confiança de 90%, ou seja, para cada grupo, a partir dos valores da média e desvio-padrão (DP) estabeleceu-se um valor máximo e mínimo (média \pm fator multiplicativo \times DP) e, quando o valor P/600 de cada animal se encontrou fora desse intervalo, este foi descartado. O valor multiplicativo padrão utilizado foi igual a 1,6449. Grupos de dados mais homogêneos foram, então, criados, excluindo-se as variáveis individuais não controladas.

Todos os dados resultantes da análise histomorfométrica foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando como nível de significância a margem de erro de 5%, analisando os sete diferentes grupos experimentais (C, Am, A1, A2, HA1, HA2 e A+HA) e os dois períodos de observação (sete e 21 dias). Os resultados estatisticamente significativos foram submetidos ao teste de Tukey.

A análise de variância e o 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 – sete dias

Em todos os grupos foram encontrados os defeitos ósseos facilmente, pois estes apresentavam margens bem definidas. Alguns cortes continham esquirolas ósseas, provavelmente originadas do ato operatório, e estas estavam contornadas por osteoblastos.

5.1.1 Grupo controle (C)

A área do defeito ósseo continha tecido de granulação, apresentando diversos fibroblastos volumosos e vasos sanguíneos neoformados, bem como infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear e intensas áreas de coágulo remanescente em organização, principalmente na região central dos defeitos (Figura 2a). Escassas trabéculas ósseas neoformadas foram observadas, apresentando-se desorganizadas e localizadas, principalmente, próximas das extremidades do defeito (Figura 3a).

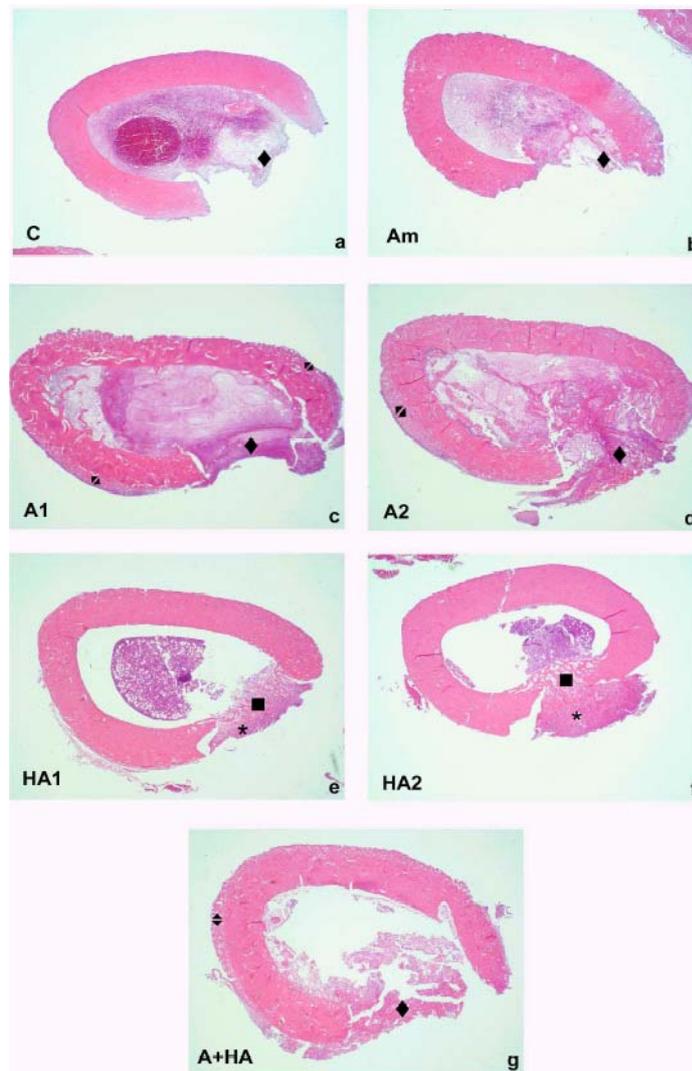


FIGURA 2 - Período de sete dias (vista panorâmica dos defeitos experimentais): **a) grupo C:** defeito ósseo preenchido por coágulo sangüíneo em organização (◆); **b) grupo Am:** defeito ósseo preenchido por coágulo sangüíneo em organização (◆); **c) grupo A1:** defeito ósseo preenchido por coágulo sangüíneo em organização (◆). Neoformação óssea extra-cortical subperiosteal (◆); **d) grupo A2:** defeito ósseo preenchido por coágulo sangüíneo em organização (◆). Neoformação óssea extra-cortical subperiosteal(◆); **e) grupo HA1:** área do defeito ósseo, recoberto por tecido conjuntivo (*), apresentando trabéculas ósseas neoformadas (■); **f) grupo HA2:** área do defeito ósseo, recoberto por tecido conjuntivo (*), apresentando trabéculas ósseas neoformadas (■); **g) grupo A+HA:** defeito ósseo preenchido por coágulo sangüíneo em organização (◆). Neoformação óssea extra-cortical subperiosteal (◆). Aumento original de 25x; HE.

Tais trabéculas continham osteócitos volumosos em lacunas amplas e estavam cobertas por osteoblastos cúbicos arranjados em fileiras, sendo os espaços medulares preenchidos por tecido conjuntivo frouxo com células osteogênicas. Em apenas um animal notou-se grande número de trabéculas ósseas neoformadas nas proximidades das margens do defeito, assim como, na região mais central do mesmo.

5.1.2 Grupo amido (Am)

A área do defeito ósseo se apresentou mal organizada (Figura 2b), sendo preenchida por tecido de granulação, apresentando infiltrado inflamatório basicamente mononuclear, áreas abscedadas, focos de hemorragia, rede de fibrina e edema intersticial (Figura 3b). Não houve neoformação óssea significativa em todos animais, sendo esta restrita às margens do defeito ósseo.

5.1.3 Grupos alendronato (A1 e A2)

Foram observados os mesmos aspectos histológicos nos grupo tratados com A1 e A2 (Figuras 2 e 3). O defeito ósseo revelou-se, geralmente, preenchido por coágulo sangüíneo (Figuras 2c e 2d), composto por extensa rede de fibrina (Figuras 3c e 3d) e infiltrado inflamatório misto, estando permeado por áreas de tecido de granulação. Alguns espécimes apresentaram trabéculas ósseas neoformadas, de aspecto imaturo, localizadas próximas às margens do defeito.

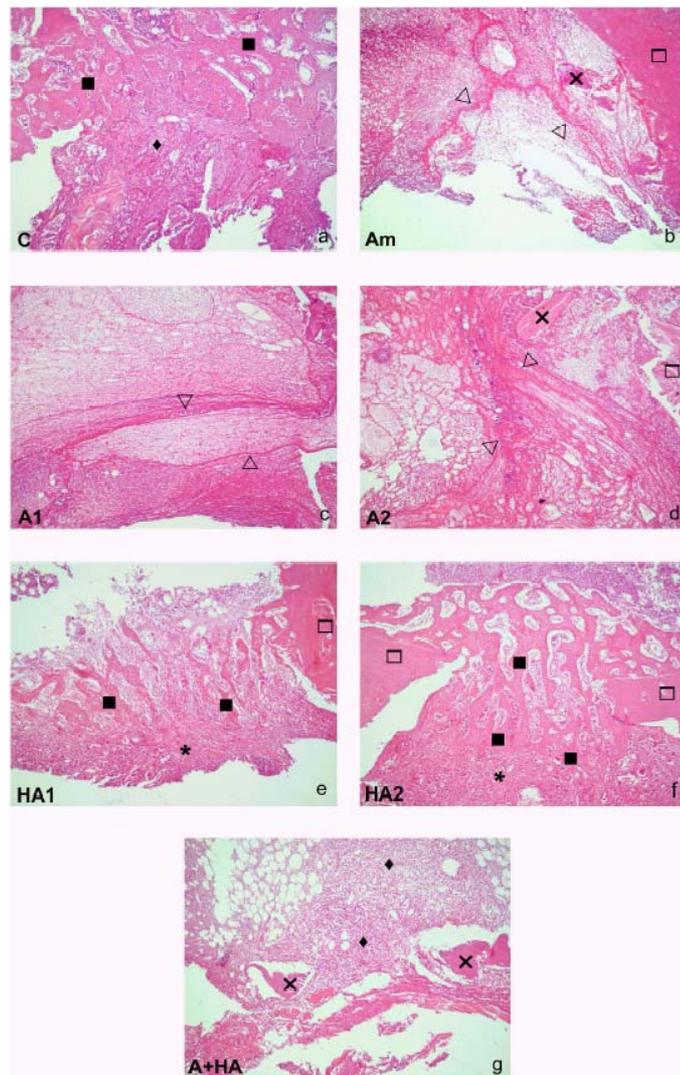


FIGURA 3 – Período de sete dias: **a) grupo C:** defeito ósseo preenchido por tecido de granulação (◆) e por trabéculas ósseas imaturas (■) interpostas por espaços medulares; **b) grupo Am:** área do defeito preenchida por coágulo sanguíneo com rede de fibrina (△). Presença de esquirola óssea (×) próxima à margem do defeito (□); **c) grupo A1:** defeito ósseo preenchido por coágulo sanguíneo composto por rede de fibrina (△); **d) grupo A2:** remanescentes de coágulo sanguíneo com rede de fibrina(△). Presença de esquirola óssea (×) próxima à margem do defeito (□); **e) grupo HA1:** defeito ósseo recoberto por tecido conjuntivo fibroso (*) e preenchido por trabéculas ósseas delicadas (■). Margem do defeito ósseo (□); **f) grupo HA2:** defeito ósseo recoberto por tecido conjuntivo fibroso (*) e preenchido por trabéculas ósseas imaturas (■). Margem do defeito ósseo (□); **g) grupo A+HA:** defeito ósseo preenchido por tecido de granulação (◆). Presença de esquirolas ósseas (×). Aumento original de 100x; HE.

Em dois espécimes do grupo A1, foi notada a presença de uma neoformação óssea na superfície externa do osso cortical, localizada, nesse caso, proximamente a área do defeito ósseo, que denominamos de neoformação óssea extra-cortical subperiosteal. No grupo A2, esse tipo de neoformação foi notada em quatro animais, estando localizada não só próxima a área da ferida cirúrgica, como também em regiões mais distantes do defeito ósseo.

5.1.4 Grupos hidroxiapatita (HA1 e HA2)

No grupo HA1 (Figura 2e), o defeito ósseo apresentava neoformação óssea originada das margens em direção ao centro, estando recoberto por tecido conjuntivo fibroso, contendo inúmeros fibroblastos e vasos sangüíneos. Observaram-se numerosas trabéculas ósseas imaturas, delgadas e desorganizadas (Figura 3e), contendo osteócitos volumosos em lacunas amplas. Essas trabéculas delimitavam amplos espaços medulares, preenchidos por tecido conjuntivo frouxo. Existiam, ainda, pequenos espaços vazios, rodeados por células osteogênicas, os quais, possivelmente, estavam preenchidos por hidroxiapatita.

A presença de tecido ósseo neoformado no interior do canal medular foi notada em cinco espécimes, e a neoformação óssea extra-cortical subperiosteal na superfície externa do osso cortical, próxima às extremidades do defeito ósseo, estava presente em apenas um animal.

No grupo HA2 (Figura 2f) observou-se maior quantidade de osso neoformado na área do defeito. As trabéculas ósseas eram mais espessas que no grupo HA1 (Figura 3f), apresentando osteócitos volumosos no interior de lacunas. Tais trabéculas estavam circundadas por osteoblastos cúbicos ou achatados e permeadas por tecido conjuntivo frouxo. Havia neoformação óssea no interior do canal medular em todos os animais, mas não em todas diferentes profundidades de cortes.

Ocorreu a neoformação óssea extra-cortical subperiosteal em três animais, sempre nas proximidades das margens do defeito em reparação.

5.1.5 Grupo associação alendronato e hidroxiapatita (A+HA)

Os defeitos ósseos apresentavam-se preenchidos por tecido de granulação com infiltrado inflamatório mononuclear, apresentando áreas de hemorragia e rede de fibrina (Figuras 2g e 3g). Houve neoformação óssea extra-cortical subperiosteal nas áreas mais distantes da região do defeito, em quase todos animais (n=6).

5.2 Análise histológica – 21 dias

5.2.1 Grupo controle (C)

Todos os animais apresentaram fechamento linear do defeito ósseo com a formação de ponte óssea (Figuras 4a e 5a). Tal ponte continha osteócitos pequenos em lacunas de tamanho variado e osteoblastos na superfície, ora cúbicos, ora achatados e os espaços medulares exibiam medula óssea hematopoiética (Figura 6a).

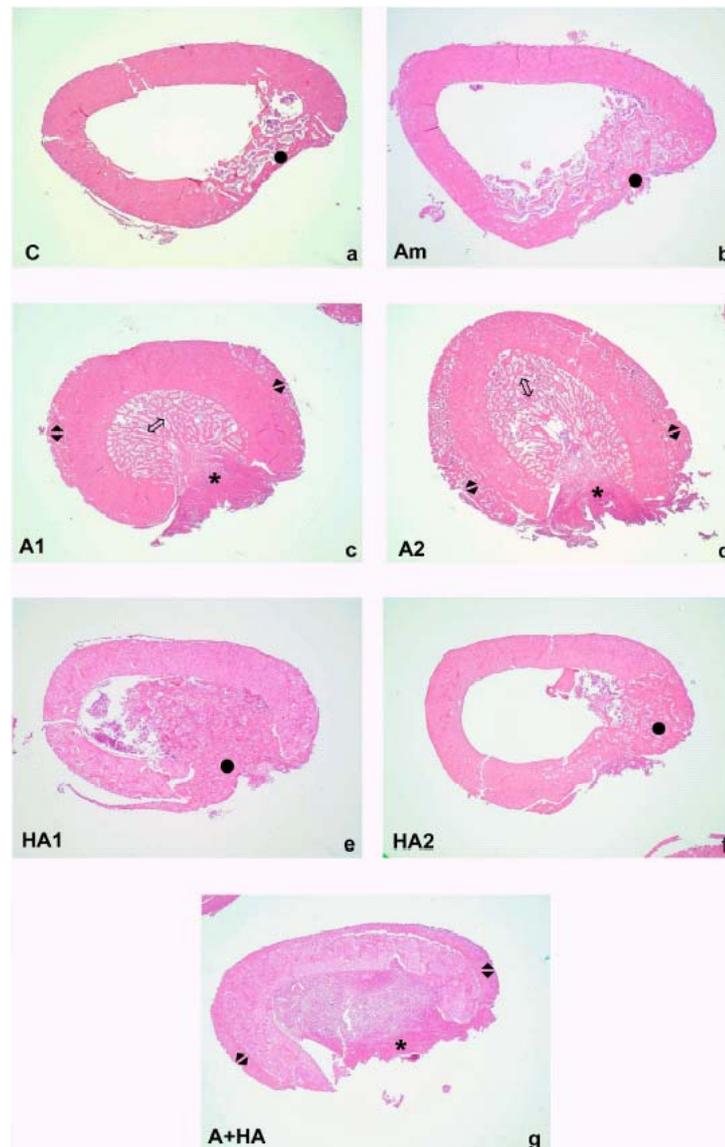


FIGURA 4 – Período de 21 dias (vista panorâmica dos defeitos experimentais): **a) grupo C:** fechamento linear do defeito com ponte óssea (●); **b) grupo Am:** fechamento do defeito em extensão por tecido ósseo neoformado (●); **c) grupo A1:** área do defeito preenchido por tecido conjuntivo fibroso (*). Trabéculas ósseas preenchendo o canal medular (⇅) e neoformação óssea extra-cortical subperiosteal (◄); **d) grupo A2:** área do defeito preenchido por tecido conjuntivo fibroso (*). Trabéculas ósseas preenchendo o canal medular (⇅) e neoformação óssea extra-cortical subperiosteal (◄); **e) grupo HA1:** fechamento do defeito em extensão por tecido ósseo neoformado (●); **f) grupo HA2:** fechamento linear do defeito com ponte óssea (●); **g) grupo A+HA:** área do defeito preenchido por tecido conjuntivo fibroso (*), não havendo fechamento do defeito por tecido ósseo. Presença de neoformação óssea extra-cortical subperiosteal (◄). Aumento original de 25x; HE.

5.2.2 Grupo amido (Am)

Em todos animais ocorreu o fechamento linear do defeito ósseo (Figura 4b) com as pontes ósseas histologicamente semelhantes às do grupo controle (Figura 5b). Em um animal, a ponte óssea apresentou-se interiorizada para a área do canal medular, ficando a região do defeito ósseo preenchida quase que totalmente por tecido conjuntivo fibroso.

5.2.3 Grupos Alendronato (A1 e A2)

Os grupos A1 e A2 apresentaram características histológicas semelhantes (Figuras 4c e 4d). Não houve fechamento linear do defeito ósseo na maioria dos animais, ficando esta região preenchida por tecido conjuntivo fibroso bem celularizado.

As trabéculas ósseas formadas no interior do canal medular (Figuras 5c e 5d) eram volumosas e continham osteócitos ora volumosos, ora pequenos contidos em lacunas de tamanho variado. Tais trabéculas eram revestidas por uma camada de osteoblastos cúbicos ou achatados e separadas por espaços medulares preenchidos, predominantemente, por tecido hematopoiético. Observou-se ainda a presença de células gigantes multinucleadas (osteoclastos) na periferia dessas trabéculas ósseas, associados, por vezes, em lacunas de reabsorção.

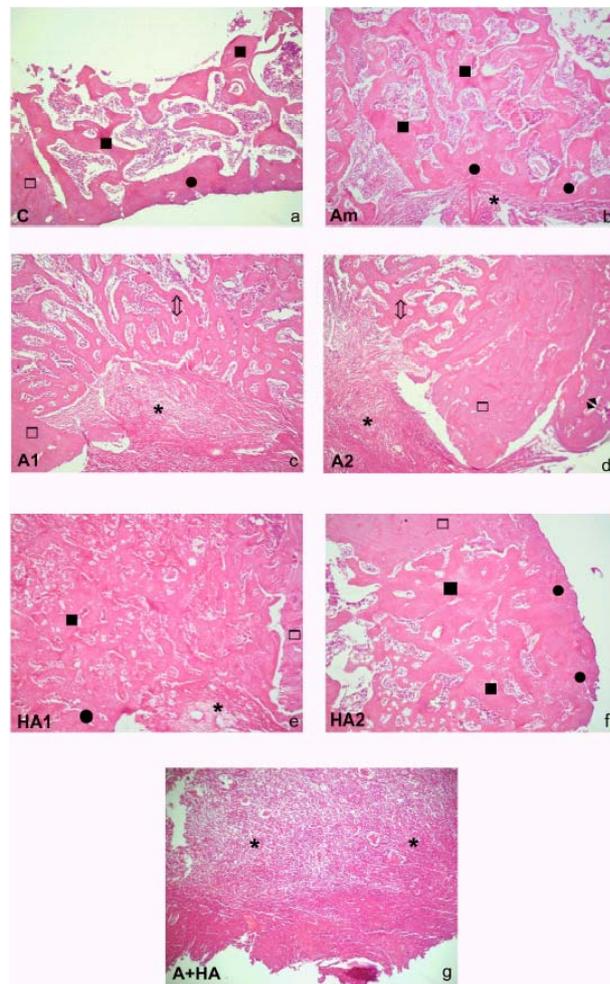


FIGURA 5 – Período de 21 dias: **a) grupo C:** fechamento ósseo linear, com a formação de ponte óssea (●), na superfície do defeito e trabéculas ósseas subjacentes (■), interpostas por espaços medulares. Margem do defeito (□); **b) grupo Am:** fechamento do defeito ósseo em extensão (●) e trabéculas ósseas subjacentes (■). Tecido conjuntivo fibroso revestindo o defeito ósseo (*); **c) grupo A1:** defeito ósseo preenchido por tecido conjuntivo fibroso (*). Canal medular preenchido por trabéculas ósseas neoformadas (⇕). Margem do defeito ósseo (□); **d) grupo A2:** margem do defeito ósseo (□) e a presença de tecido conjuntivo fibroso (*) na área do defeito. Trabéculas ósseas neoformadas preenchendo o canal medular (⇕) e, externamente, a presença de neoformação óssea extra-cortical subperiosteal (◆); **e) grupo HA1:** fechamento ósseo superficial do defeito (●), recoberto por tecido conjuntivo fibroso (*). Trabéculas ósseas subjacentes (■), e evidente margem do defeito (□); **f) grupo HA2:** fechamento linear do defeito ósseo com a formação de ponte óssea (●) e trabéculas ósseas subjacentes volumosas (■). Margem do defeito (□); **g) grupo A+HA:** área do defeito ósseo preenchida por tecido conjuntivo fibroso. Aumento original de 100x; HE.

Em todos os animais de ambos os grupos, encontramos neoformação óssea extra-cortical subperiosteal de aspecto trabecular localizada próximo ou mais distante da área do defeito ósseo, ou até mesmo circundando toda a extensão externa do fêmur (Figuras 4c e 4d). Tal tecido ósseo exibia trabéculas ósseas ricas em osteócitos, permeadas por espaços medulares, sendo revestido por periósteo. Verificou-se nitidamente o limite entre o osso cortical compacto maduro e o tecido ósseo neoformado, chegando até, em alguns animais, ocorrer a separação desses tecidos, na região de união entre ambos.

No grupo A2, a neoformação óssea extra-cortical subperiosteal (Figura 5d) era mais volumosa que no grupo A1. Em um animal de cada grupo, essa neoformação óssea extra-cortical subperiosteal cresceu até as extremidades do defeito, invadindo-o e provocando o fechamento do mesmo. No animal do grupo A1, essa neoformação óssea extra-cortical subperiosteal tornou-se contínua com o tecido ósseo que preenchia a cavidade medular. Esses dois animais foram exceções dentro dos grupos alendronato, pois a região do defeito ósseo apresentava inúmeras trabéculas neoformadas oriundas, provavelmente, da proliferação da neoformação óssea extra-cortical subperiosteal.

5.2.4 Grupos Hidroxiapatita (HA1 e HA2)

Nesses grupos, evidenciou-se o fechamento linear do defeito em toda extensão por tecido ósseo mais maduro e organizado com aspecto cortical, que unia as margens do defeito por vezes pouco definidas (Figuras 4e e 4f). A única exceção foi um animal do grupo HA1, que não apresentou fechamento total do defeito ósseo, contudo o canal medular apresentava-se preenchido por inúmeras trabéculas ósseas.

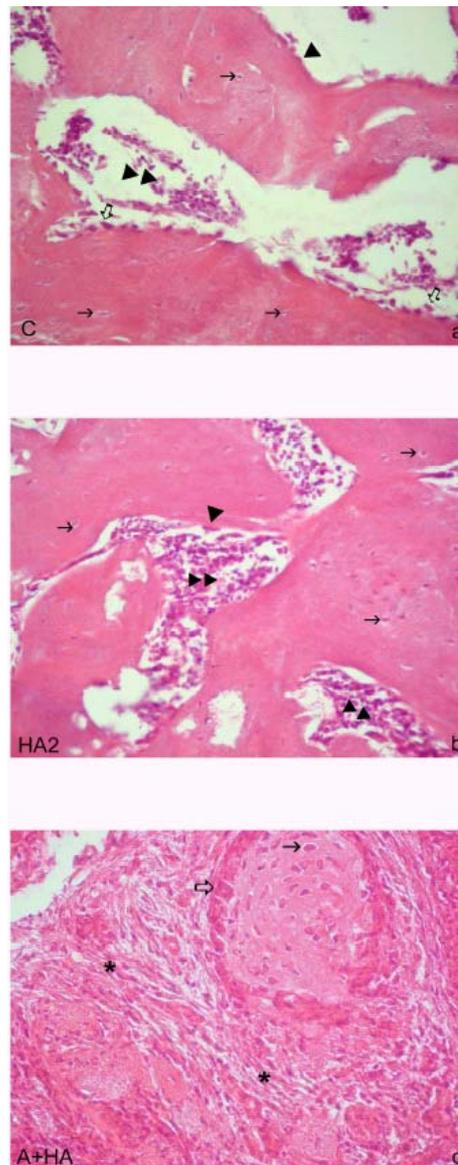


FIGURA 6 – Período de 21 dias: **a) grupo C:** defeito ósseo preenchido por trabéculas ósseas neoformadas, apresentando osteócitos pequenos em lacunas de tamanho variado (→). Tais trabéculas estavam revestidas por osteoblastos cúbicos (⇨), em fileira, ou achatados (▶), estando circundadas por tecido hematopoiético (▶▶); **b) grupo HA2:** região do defeito ósseo preenchida por trabéculas ósseas maduras e volumosas, apresentando osteócitos pequenos em lacunas (→). As trabéculas estavam intermeadas por tecido hematopoiético (▶▶) e revestidas por osteoblastos achatados (▶); **c) grupo A+HA:** área do defeito ósseo preenchida por tecido conjuntivo fibroso (*), contendo pequenas áreas de tecido osteóide, que apresentava osteócitos volumosos no interior de lacunas (→) e, na superfície, células osteogénicas (⇨). Aumento original de 400x; HE.

Uma enorme quantidade de trabéculas ósseas maduras, na área do defeito ósseo, foi encontrada nesses grupos, sendo as do grupo HA2 mais volumosas (Figuras 5e e 5f). Notou-se, nessas trabéculas ósseas a presença de osteoblastos cúbicos ou achatados e osteócitos volumosos no grupo HA1, enquanto, no grupo HA2, foram observados osteócitos pequenos em lacunas visíveis e osteoblastos achatados no grupo HA2 (Figura 6b).

As trabéculas ósseas no interior do canal medular foram encontradas em cinco animais do grupo HA1 e em seis do grupo HA2, e estas se apresentavam volumosas e envolvidas por tecido hematopoiético.

5.2.5 Grupo associação alendronato e hidroxiapatita (A+HA)

O fechamento linear do defeito ocorreu em dois animais apenas e, num terceiro, a formação da ponte óssea não ocorreu em todos os planos de corte. As trabéculas ósseas neoformadas, presentes no interior do defeito ósseo, apresentavam-se com osteócitos pequenos ou volumosos localizados em lacunas e eram circundadas por osteoblastos cúbicos ou achatados. Os espaços medulares apresentavam tecido celularizado com aspecto osteogênico.

Nos outros espécimes, o defeito ósseo permaneceu preenchido por tecido conjuntivo fibroso (Figura 4g e 5g) com infiltrado inflamatório mononuclear com a presença de pequenas áreas de tecido com aspecto osteóide, com osteócitos volumosos presentes em lacunas (Figura 6c).

A maioria (n=6) dos animais apresentou a neoformação óssea extra-cortical subperiosteal de aspecto trabecular, histologicamente semelhante ao dos grupos A1 e A2 (Figura 4g).

5.3 Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica ofereceu dados numéricos da quantidade de osso neoformado em cada grupo de estudo, em dois diferentes períodos de observação. O número absoluto de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas neoformadas e a média proporcional de osso neoformado no interior do defeito ósseo (P/600) estão apresentados nas Tabelas 1-7.

Tabela 1 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e a média proporcional de osso neoformado no interior do defeito ósseo (P/600) do grupo C, nos períodos de sete e 21 dias

Grupo	Sete dias		21 dias	
	P	P/600	P	P/600
C	119	0,1983*	171	0,2850
C	14	0,0233	200	0,3333
C	24	0,0400	197	0,3283
C	48	0,0080	142	0,2367
C	39	0,0650	181	0,3017
C	43	0,0717	120	0,2000
C	3	0,0050	119	0,1983

P/600 (média proporcional)

* Amostra com média proporcional fora do intervalo de confiança de 90%

Tabela 2 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e a média proporcional de osso neoformado no interior do defeito ósseo (P/600) do grupo Am, nos períodos de sete e 21 dias

Grupo	Sete dias		21 dias	
	P	P/600	P	P/600
Am	0	0,0	218	0,3633
Am	0	0,0	243	0,4050
Am	11	0,0183*	243	0,4050
Am	0	0,0	197	0,3283
Am	5	0,0083	86	0,1433
Am	0	0,0	39	0,0650
Am	1	0,0017	112	0,1867

P/600 (média proporcional)

* Amostra com média proporcional fora do intervalo de confiança de 90%

Tabela 3 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e a média proporcional de osso neoformado no interior do defeito ósseo (P/600) do grupo A1, nos períodos de sete e 21 dias

Grupo	Sete dias		21 dias	
	P	P/600	P	P/600
A1	0	0,0	21	0,0350
A1	9	0,0015	10	0,0167
A1	11	0,0183	02	0,0033
A1	8	0,0133	85	0,1417*
A1	5	0,0083	16	0,0267
A1	16	0,0267	44	0,0733
A1	0	0,0	36	0,0600

% = P/600 (média proporcional)

* Amostra com média proporcional fora do intervalo de confiança de 90%

Tabela 4 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e a média proporcional de osso neoformado no interior do defeito ósseo (P/600) do grupo A2, nos períodos de sete e 21 dias

Grupo	Sete dias		21 dias	
	P	P/600	P	P/600
A2	5	0,0083	13	0,0217
A2	0	0,0	59	0,0983
A2	0	0,0	51	0,0850
A2	0	0,0	24	0,0400
A2	8	0,0133*	58	0,0967
A2	0	0,0	32	0,0533
A2	0	0,0	293	0,4883*

P/600 (média proporcional)

* Amostras com média proporcional fora do intervalo de confiança de 90%

Tabela 5 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e a média proporcional de osso neoformado no interior do defeito ósseo (P/600) do grupo HA1, nos períodos de sete e 21 dias

Grupo	Sete dias		21 dias	
	P	P/600	P	P/600
HA1	13	0,0217	189	0,3150
HA1	17	0,0283	99	0,1650
HA1	15	0,0250	167	0,2783
HA1	15	0,0250	169	0,2817
HA1	5	0,0083	133	0,2217
HA1	49	0,0817*	171	0,2850
HA1	1	0,0017	21	0,0350*

P/600 (média proporcional)

* Amostras com média proporcional fora do intervalo de confiança de 90%

Tabela 6 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e a média proporcional de osso neoformado no interior do defeito ósseo (P/600) do grupo HA2, nos períodos de sete e 21 dias

Grupo	Sete dias		21 dias	
	P	P/600	P	P/600
HA2	37	0,0617	195	0,3250
HA2	4	0,0067	360	0,6000
HA2	120	0,2000	263	0,4383
HA2	156	0,2600	369	0,6150
HA2	43	0,0717	192	0,3200
HA2	90	0,1500	194	0,3233
HA2	80	0,1333	201	0,3350

P/600 (média proporcional)

Tabela 7 - Resultado da contagem total de pontos (P) de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas e a média proporcional de osso neoformado no interior do defeito ósseo (P/600) do grupo A+HA, nos períodos de sete e 21 dias

Grupo	Sete dias		21 dias	
	P	P/600	P	P/600
A+HA	11	0,0183	123	0,2050
A+HA	0	0,0	120	0,2000
A+HA	25	0,0417*	19	0,0317
A+HA	1	0,0017	103	0,1717
A+HA	0	0,0	220	0,3667*
A+HA	0	0,0	0	0,0
A+HA	0	0,0	11	0,0183

P/600 (média proporcional)

* Amostras com média proporcional fora do intervalo de confiança de 90%

5.4 Análise estatística

Os dados obtidos a partir da análise histomorfométrica foram submetidos à análise estatística descritiva e à análise de variância (ANOVA) com duas variáveis conhecidas (grupos experimentais e período de observação).

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados da estatística descritiva (média e desvio-padrão), assim como a aplicação do intervalo de confiança de 90%, estabelecendo a exclusão de elementos (animais com P/600 destacados na Tabelas 1-7), que não se encaixaram entre os valores máximo e mínimo desse intervalo (média do grupo \pm fator padrão \times DP). Esse critério adotado alterou o número de animais por grupo (n), estando o novo valor indicado na Tabela 8. A representação gráfica da análise estatística descritiva se encontra na Figura 7.

Tabela 8 – Estatística descritiva referente aos grupos experimentais (C, Am, A1, A2, HA1, HA2, A+HA) nos períodos de sete e 21 dias

Grupos	Período	Média	DP	n
C	7 dias	0,0475	0,0296	6
Am	7 dias	0,0017	0,0033	6
A1	7 dias	0,0117	0,0097	7
A2	7 dias	0,0014	0,0034	6
HA1	7 dias	0,0183	0,0107	6
HA2	7 dias	0,1262	0,0870	7
A+HA	7 dias	0,0033	0,0074	6
C	21 dias	0,2690	0,0574	7
Am	21 dias	0,2710	0,1376	7
A1	21 dias	0,0358	0,0265	6
A2	21 dias	0,0658	0,0321	6
HA1	21 dias	0,2578	0,0546	6
HA2	21 dias	0,4224	0,1331	7
A+HA	21 dias	0,1044	0,0973	6

n: número de animais por grupo após a utilização do intervalo de confiança de 90%.

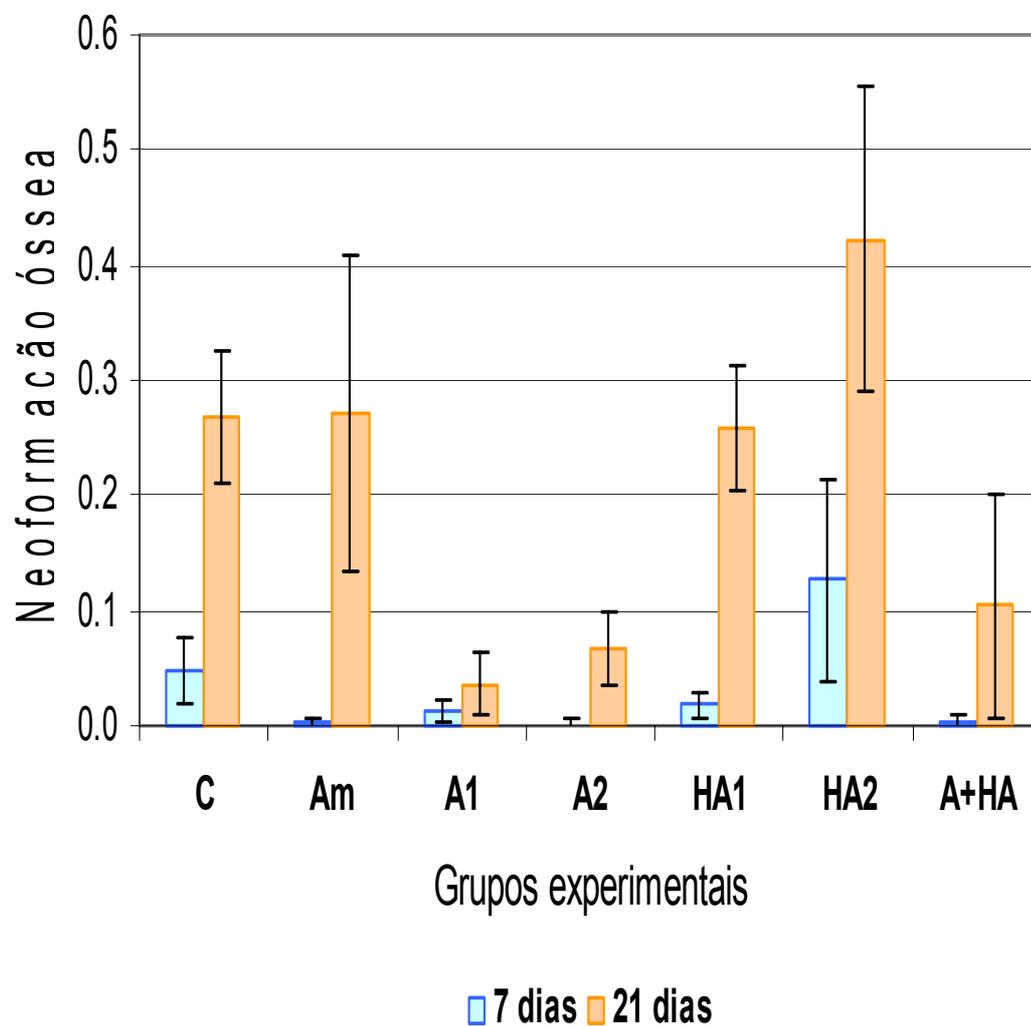


FIGURA 7 – Médias e desvios-padrão da neoformação óssea nos grupos experimentais (C, Am, A1, A2, H1, H2 A+HA), nos períodos de sete e 21 dias

Após a realização do teste ANOVA foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os períodos avaliados ($p=0,0000$), entre os grupos experimentais ($p=0,0000$) e na interação dessas duas variáveis ($p=0,0000$) (Tabela 9).

Tabela 9 – Análise de variância para duas variáveis estudadas

Variáveis	Soma dos quadrados	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	F	p
Grupos	0,621262	6	0,103544	21,4563	0.0000*
Períodos	0,667989	1	0,667989	138,4205	0.0000*
Interação	0,226088	6	0,037681	7,8083	0.0000*
Erro	0,361935	75	0,004826		
Total	1,877274	88			

* $p<0,05$ = diferença estatisticamente significativa

Uma vez que a análise de variância acusou diferenças estatisticamente significantes entre os fatores abordados (grupo experimental, período de observação e interação dessas variáveis), tornou-se necessária a aplicação do teste de Tukey a 5% para comparar os diversos valores entre si (Tabela 10).

Tabela 10 – Formação de grupos homogêneos após o teste de Tukey (5%) para as variáveis grupos experimentais e período de observação, em relação à média de neoformação óssea

Grupos homogêneos*			Grupos experimentais	Período de observação	Média
a			A2	7 dias	0,001389
a			Am	7 dias	0,001667
a			A+HA	7 dias	0,003333
a			A1	7 dias	0,011667
a			HA1	7 dias	0,018333
a			A1	21 dias	0,035833
a			C	7 dias	0,047500
a			A2	21 dias	0,065833
a			A+HA	21 dias	0,104444
a	b		HA2	7 dias	0,126190
	b	c	HA1	21 dias	0,257778
		c	C	21 dias	0,269048
		c	Am	21 dias	0,270952
		d	HA2	21 dias	0,422381

*médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente a 5%

Analisando a Tabela 10, verificamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos no período de sete dias, apesar do grupo HA2 apresentar a maior média. Nesse grupo houve variação entre os dados, como observado na Figura 7.

Não houve diferença estatística entre os dois períodos de estudo para os grupos A1, A2 e A+HA. Os demais grupos apresentaram-se diferentes estatisticamente, quando se compararam os dois períodos de estudo, estando o tempo de 21 dias com os melhores resultados.

Não houve diferença estatística entre os grupos C e Am após sete e 21 dias, mesmo o grupo C apresentando maior valor de média no primeiro período de estudo.

Os grupos HA2 de sete dias e HA1 de 21 dias não diferiram entre si. O grupo HA2 de 21 dias apresentou o melhor resultado, sendo diferente estatisticamente de todos os demais grupos experimentais.

6 DISCUSSÃO

Nesse trabalho utilizamos um modelo animal experimental com a intenção de simular a perda óssea, que ocorre na pós-menopausa humana, e, para tanto, realizou-se a ovariectomia bilateral em ratas Wistar com peso aproximado de 250g, o que correspondeu a, aproximadamente, três meses de idade. Wronski et al.¹³⁹ (1988) descreveram que ratas com 240g ovariectomizadas já apresentavam aumento nos índices de *turnover* ósseo em ossos longos. Tal aumento ocorreu, principalmente, durante os estágios iniciais de deficiência estrogênica, o que correspondeu ao primeiro mês pós-ovariectomia, seguido, depois, por um declínio gradual até se estabilizar no centésimo dia de estudo. Segundo Kalu⁶⁰ (1991), esse tipo de modelo animal foi denominado de “modelo com ratos maduros”, pois se contrapõe àquele que utiliza ratos de 12 meses de idade (“modelo com ratos senescentes”). O protocolo que utilizamos, baseados em Wronski et al.¹³⁹ (1988), Kalu⁶⁰ (1991) e Junqueira et al.⁵⁸ (2005), possuía a vantagem de se trabalhar com ratos jovens (250g de peso em média, correspondendo a cerca de três meses de idade), mas considerados adultos e maduros para se reproduzirem (HARKNESS & WAGNER⁵⁰, 1993). Esses animais são de fácil manutenção, pois após poucos meses já estão disponíveis para a pesquisa e, principalmente, por apresentarem os efeitos da ovariectomia no tecido ósseo em um mês ou menos, sendo as características de perda óssea similares às que ocorrem nos ratos senescentes.

Junqueira et al.⁵⁸ (2005) relataram que o ganho de peso em fêmeas operadas é um dos indícios comprovadores da eficácia da excisão ovariana. Segundo esses autores, após 28 dias da ovariectomia, os animais apresentavam aumento de 20,36% no peso, redução de três e cinco vezes, respectivamente, nos níveis de estradiol e progesterona e, que esses dados comprovam a similaridade desse modelo experimental com as alterações hormonais sofridas pelas mulheres na pós-menopausa. A intenção do nosso trabalho não foi realizar dosagens hormonais nos animais, mas era visível o ganho de peso dos mesmos após trinta dias.

Teófilo et al.¹²⁹ (2003) relataram que as metáfises de um osso longo em ratos, no caso estudado se tratavam de tíbias, são mais afetados pela deficiência estrogênica, quando comparado aos ossos da face, sendo, que mesmo após 11 semanas, os parâmetros de perda óssea estudados (peso seco e da cinza óssea) permaneciam inalterados para os maxilares. Esse fato reforça a nossa escolha pela utilização de um osso longo, no caso o fêmur, ao invés de um osso da face. Na literatura científica, quando se pesquisa ovariectomia em ratos, muitos trabalhos são encontrados utilizando tíbias para a confecção de defeito ósseo. Optamos em realizar os defeitos em fêmures, apesar de ser essa uma cirurgia mais difícil, por esse trabalho fazer parte de um estudo maior, que abordou, em outras pesquisas, reparação óssea em ratos geneticamente hipertensos (SHR) e tais animais apresentam ossos longos mais finos, principalmente as fêmeas, sendo arriscadas as cirurgias em tíbias. Assim, para futuras análises comparativas, preferiu-se um osso longo mais calibroso, como o fêmur.

Na realização dos defeitos femurais utilizou-se a broca de aço trefina, pela facilidade em se padronizar o diâmetro das cavidades e, por isso, esse tipo de instrumento rotatório tem sido utilizado em outros trabalhos científicos (FIGUEIREDO et al.³⁷, 2001; BRAZ et al.¹⁶, 2003; FERREIRA et al.³⁶, 2004; PEREIRA⁹¹, 2004; ALTUNDAL & GURSOY³, 2005; FERNANDES³⁵, 2005; JAIME et al.⁵⁵, 2005). Utilizamos trefinas

com diâmetros interno e externo de 2,0 e 2,5mm, respectivamente, que produziram, então, defeitos ósseos de 2,5mm nos fêmures. A confecção de defeitos ósseos, para o estudo de reparação, é um bom modelo experimental e tem sido amplamente utilizado (ALMEIDA et al.¹, 2000; FIGUEIREDO et al.³⁷; 2006; BRAZ et al.¹⁶, 2003; FERREIRA et al.³⁶, 2004; PEREIRA⁹¹, 2004; FERNANDES³⁵, 2005; JAIME et al.⁵⁵, 2005). Na reparação óssea experimental pode-se utilizar o defeito ósseo denominado de defeito crítico, para que não ocorra a regeneração espontânea, permitindo avaliar corretamente o potencial osteogênico da variável a ser estudada, por exemplo, a ação de certo medicamento (FRAME⁴⁰, 1980; SILVEIRA¹¹⁹, 2004). O fechamento linear do defeito ósseo ocorreu em nosso trabalho, em alguns grupos de animais, no período de 21 dias, e, portanto, o tamanho do defeito ósseo utilizado não foi crítico. Entretanto, baseado em Gosain et al.⁴⁶ (2000), como não houve o preenchimento completo da área com osso cortical durante o tempo de experimento, pôde-se considerar o tamanho utilizado como crítico para os dois períodos desse estudo. Na nossa análise histológica e histomorfométrica no período mais longo (21 dias), o osso neoformado no local do defeito diferia do osso antigo, o que permitiu a análise da reparação óssea sob a influência ou não das substâncias inseridas no local da cirurgia. Além disto, não está determinado, na literatura, o tamanho crítico de defeito em fêmures de ratos, existindo escassos estudos relacionados (SHEN et al.¹¹⁷, 2004; CHEN et al.¹⁹, 2005; JAGER et al.⁵⁴, 2005; LITTLE et al.⁷¹, 2005).

Desse modo, elegemos o fêmur como o local de confecção dos defeitos ósseos experimentais de 2,5mm de diâmetro. Não foi possível confeccionar defeitos maiores devido ao tamanho não tão expressivo dos fêmures, pois se tratavam de fêmeas adultas jovens, apresentando perda óssea induzida por ovariectomia, evitando, assim, fraturas femurais e, conseqüente, perda de animal. O tamanho do defeito escolhido cumpriu os requisitos necessários para avaliação da

reparação, pois não ocorreu o preenchimento da área total do mesmo no último período de observação.

Alguns autores, como Almeida et al.¹, 2000, citam a necessidade da utilização de uma barreira física, como uma membrana absorvível, para impedir a penetração de tecido conjuntivo na região do defeito, principalmente quando se trabalha com mandíbulas. Salata et al.¹¹⁰ (1998) avaliaram o efeito da hidroxiapatita sobre o reparo de lesões ósseas nas mandíbulas de ratos, associando ou não o uso de membrana, e constataram que a utilização de barreira física não aumentou a quantidade de osso formado. Dessa maneira, ao realizarmos os defeitos em fêmures não inserimos mais uma variável na pesquisa, ou seja, o uso de membrana. Não se descartou uma futura utilização de alguma barreira física, mas para impedir o deslocamento da substância inserida na cavidade cirúrgica para os tecidos subjacentes durante a manipulação das estruturas locais e sangramento decorrente do feitiço do defeito ósseo.

A análise estatística utilizou, como padronização dos dados presentes em cada grupo, um intervalo de confiança de 90%, excluindo amostras díspares, que prejudicariam a análise mais coerente dos resultados. Essa exclusão seguiu um critério e não foi aleatória. Foi excluído apenas um animal nos grupos C, Am, A2, HA1 e A+HA no período de sete dias, e, também, um animal de cada grupo A1, A2, HA1 e A+HA no período de 21 dias. Alguns desses animais foram citados como exceções na descrição histológica desse trabalho, pois se apresentavam com processo de reparação diferente de todos os outros animais, provavelmente devido a alguma variável individual difícil de ser identificada e discutida. As variáveis conhecidas nesse trabalho foram período e grupo experimental. Na intenção de excluir a influência de uma possível infecção secundária, de um processo inflamatório descontrolado e de quadro doloroso, que causariam alterações no processo de reparação óssea, administramos antibióticos e antiinflamatórios a todos animais, após o feitiço do defeito ósseo. Essa conduta ocorreu em outros

trabalhos que utilizaram alendronato e/ou hidroxiapatita e em nenhum deles existiu o relato de interferência na ação dessas substâncias pelo uso de antibióticos e antiinflamatórios (ROSA et al.¹⁰⁴, 1995; LEW et al.⁶⁷, 1997; BOECK et al.¹³, 1999; MERAW & REEVE⁸¹, 1999; MERAW et al.⁸², 1999; GOSAIN et al.⁴⁶, 2000; Da PAZ et al.²⁴, 2001; FIGUEIREDO et al.³⁷, 2001; BRANDÃO et al.¹⁴, 2002; MOCHIDA et al.⁸⁴, 2002; MOREIRA et al.⁸⁶, 2003)

Na metodologia do trabalho utilizamos como unidade, para dosar as substâncias, massa molecular e mol, pois um dos grandes desafios foi resolver a questão da associação do alendronato sódico com a hidroxiapatita, que foi solucionado trabalhando com 1mol de alendronato e 1mol de hidroxiapatita. Essa unidade pode parecer confusa no primeiro contato, mas possui a lógica de disponibilizar no interior da cavidade óssea o mesmo número de moléculas das duas substâncias utilizadas. Esse tipo de abordagem já foi utilizada em outros trabalhos, como os de Sato et al.¹¹³, 1991, Garcia-Moreno et al.⁴³, 1991; Pereira⁹¹, 2004; Fernandes³⁵, 2005. A necessidade do uso do amido como excipiente surgiu, pois a hidroxiapatita possuía massa molecular de quase o dobro da do alendronato. Nossa preocupação foi a possível influência do amido no processo de reparação óssea, mas as análises histológica e histomorfométrica nos mostraram que o mesmo não prejudicou, nem favoreceu a neoformação óssea. Nos grupos de períodos de sete e 21 dias não houve diferença estatística significativa entre o grupo C e o grupo Am. Numericamente, o grupo C apresentou maior neoformação óssea que o grupo Am, mas no controle de sete dias existiu uma variação das amostras. Microscopicamente, os dois grupos (C e Am) se mostravam muito semelhantes após sete dias, com a presença de tecido de granulação com infiltrado inflamatório difuso, áreas de hemorragia e apresentavam formação de trabéculas imaturas a partir da borda do defeito. Nos grupos de 21 dias, ocorreu o fechamento linear do defeito

ósseo em todos espécimes com trabéculas ósseas apresentando características histológicas muito parecidas.

As medidas da análise histomorfométrica foram realizadas no centro do defeito ósseo. Padronizou-se este local para a medição por ser a região na qual o tecido ósseo se formava por último. Sendo assim, mesmo havendo um fechamento linear do defeito, mas não o seu preenchimento total, pudemos comparar os grupos entre si quanto a quantidade de osso formado. O grupo controle apresentou baixa neoformação óssea no período de sete dias, mesmo havendo a presença de trabéculas neoformadas nas margens do defeito, mas pela nossa padronização de avaliar o centro da lesão, a região marginal foi desprezada. Essa baixa neoformação no controle de sete dias verificada diferiu dos achados de Silveira¹¹⁹ (2004), que relatou intensa neoformação óssea nesse período em ratas ovariectomizadas com a presença de trabéculas ósseas delicadas de aspecto osteóide no centro do defeito ósseo. Após sete dias, constatamos que os espécimes dos grupos C e Am ainda apresentavam áreas de hemorragia na região do defeito e/ou mais profundamente localizadas, sugerindo que a fase de substituição do coágulo por tecido de granulação ainda não havia se completado. No período de 21 dias, o grupo C apresentou intensa neoformação óssea, existindo diferença estatística significativa entre os dois períodos de estudo para esse grupo.

O alendronato sódico é um medicamento muito utilizado no tratamento e prevenção da osteoporose humana (RUSSEL & ROGERS¹⁰⁷, 1999; RODAN & MARTIN¹⁰¹, 2000; CRANNEY²³, 2003; SEEMAN & EISMAN¹¹⁶, 2004). Diversos trabalhos científicos utilizaram enorme amostra de pacientes e constataram aumento na densidade mineral óssea e redução de fraturas em mulheres e homens com osteoporose (LIBERMAN et al.⁶⁸, 1995; ORWOLL et al.⁸⁹, 2000; BAUER et al.⁹, 2004; ENSRUD et al.³⁰, 2004; OZDEMIR & RODOPLU⁹⁰, 2005).

Rocha et al.⁹⁹ (2004) indicaram este medicamento como auxiliar no tratamento da doença periodontal em mulheres na pós-menopausa.

A deficiência de estrógenos resulta num aumento na taxa de remodelação óssea decorrente do aumento da osteoclastogênese. Esta é mediada por células da medula óssea ou por osteoblastos, que liberam citocinas ou aumentam a expressão de receptores superficiais (RANK-L) estimuladores de osteoclastos ou dos seus progenitores (MANOLAGAS⁷⁵, 1995; TEITELBAUM¹²⁷, 2000; DUONG & RODAN²⁸, 2001; UDAGAWA¹³⁵, 2002; EASTELL²⁵, 2003). O alendronato age diminuindo o *turnover* ósseo, pois é liberado, após incorporação na estrutura óssea, no momento em que os osteoclastos atuam sobre a matriz óssea (RODAN & FLEISH¹⁰⁰, 1996). Essa ação do bisfosfonato pode ser direta sobre os osteoclastos, agindo o medicamento na via celular do mevalonato (FISHER et al.³⁸, 1999; Van BEEK et al.¹³⁶, 1999; ROGERS et al.¹⁰³, 2000) ou indireta através de mecanismos em que os osteoblastos participam, não havendo a necessidade do contato do osteoclasto com o tecido ósseo impregnado pelo alendronato (SAHNI et al.¹⁰⁹, 1993). Há controvérsias, na literatura, se o alendronato induz apoptose nos osteoclastos, mas alguns autores afirmam, baseados até em experimentos em ratos, a diminuição do número de células positivas para fosfatase ácida tartrato-resistente, sendo esta uma reação citoquímica, que distingue osteoclastos de outras células gigantes (NISHIKAWA et al.⁸⁸, 1996; VITTÉ et al.¹³⁷, 1996; HALASY-NAGY et al.⁴⁸, 2001; ALTUNDAL & GUVENER⁴, 2004; MIYAJI et al.⁸³, 2005). Nós localizamos em todos os grupos, no período de 21 dias, a presença de células gigantes, sugestivas de serem osteoclastos, na região de neoformação óssea, mas não fizemos nenhuma reação citoquímica para poder afirmar se houve ou não redução no número dessas células nos grupos A1 e A2, podendo este estudo ocorrer em pesquisas futuras. A presença dessas células gigantes multinucleadas sugere uma fase de

remodelação óssea compatível com esse período de estudo (21 dias) (SILVEIRA¹¹⁹, 2004)

No período de sete dias de experimento, verificou-se, histologicamente, que o grupo C apresentava a área do defeito ósseo preenchida por tecido de granulação, mas, nos grupos A1 e A2, o defeito ósseo ainda estava preenchido por coágulo sanguíneo, demonstrando um retardo na reparação óssea induzida pelo alendronato. Esse atraso na organização tecidual pode ter ocorrido devido as propriedades pró-inflamatórias do alendronato, que induz a liberação, por células mononucleares, de citocinas relacionadas ao processo inflamatório (Il-1 β , Il-6, TNF) (PIETSCHMANN et al.⁹³, 1988; MAKKONEN et al.⁷⁴, 1999). Na análise histomorfométrica não houve diferença estatística significativa entre os grupos C, A1 e A2, em relação à quantidade de osso neoformado, apesar do grupo C se apresentar, no geral, em estado de reparação mais adiantado.

Alguns animais dos grupos A1, A2 e A+HA apresentaram lesão cutânea ulcerosa recoberta por crosta escurecida e purulenta na região onde havia as suturas. Tais lesões se resolveram espontaneamente num intervalo de uma semana. Histologicamente, havia uma cavidade no interior da lesão preenchida por inúmeros neutrófilos, estando a mesma circundada por tecido de granulação, ou seja, ocorreu a formação de abscesso (dados não apresentados). Como não ocorreu a presença de lesões em animais dos outros grupos, concluímos que o alendronato inserido no interior do defeito ósseo deslocou-se para os outros tecidos adjacentes, provocando necrose tecidual. Essas lesões eram superficiais e se restringiram a camada subcutânea, não atingindo a região do defeito ósseo. Após uma semana, a área da cirurgia se apresentava cicatrizada como nos outros grupos. Moreira et al.⁸⁶ (2005) inseriram uma pasta de alendronato em polietilenoglicol no tecido subcutâneo de ratos e descreveram as mesmas características histológicas percebidas por nós. A diferença ocorrida com o nosso

trabalho foi a duração do tempo de necrose tecidual, que no trabalho desses autores perdurou por até 14 dias. É muito comum na literatura o relato clínico de desconforto esofágico em pacientes usuários de alendronato, o que foi explicado pelo contato crônico e direto do medicamento com a mucosa (FERNANDES et al.³⁴, 2002; BISWAS et al.¹¹, 2003; SAMBROOK et al.¹¹¹, 2003).

Esses acontecimentos não impossibilitam a utilização local do alendronato, até porque existem poucos trabalhos na literatura com esse tipo de aplicação. Vários estudos experimentais em animais, inclusive em ratas ovariectomizadas, avaliaram o controle da reabsorção do osso alveolar na periodontite induzida e obtiveram resultados favoráveis nos grupos tratados com alendronato, mas a administração do bisfosfonato ocorreu por via oral, intravenosa ou subcutânea (WEINREB et al.¹³⁸, 1994; REDDY et al.⁹⁷, 1995; DUARTE et al.²⁷, 2004; MENEZES et al.⁸⁰, 2005). Já Fayad³² (2001) e Fernandes³⁴ (2002) administrando alendronato, por via oral, em animais com defeitos cirúrgicos em mandíbulas, perceberam que o medicamento não interferiu na reparação óssea.

Há estudos com ratas ovariectomizadas ou não, que avaliaram a ação do alendronato sobre o fêmur submetido ou não a defeito cirúrgico. Da Paz et al.²⁴ (2001) perceberam o aumento no número de trabéculas ósseas nos animais que receberam alendronato por via subcutânea. Altundal & Gursoy³ (2005) também administraram alendronato por via subcutânea e obtiveram os melhores resultados relacionados com a neoformação óssea nas ratas medicadas. Sliwinski et al.¹²² (2004) e Pytlik et al.⁹⁵ (2004) controlaram as alterações ósseas induzidas pela ovariectomia com administrações diárias, por via oral, mas, em outros animais, o bisfosfonato foi associado à vitamina A e os autores concluíram que a vitamina atenuou os efeitos observados com o alendronato isoladamente.

Há estudos utilizando aplicação local do alendronato em tecido ósseo. Jaime et al.⁵⁵ (2005) avaliaram o efeito tópico do alendronato, embebido em uma esponja de colágeno, em efeitos cirúrgicos, de 8 mm de diâmetro, realizados nas calotas de ratas ovariectomizadas e não obtiveram maior neoformação óssea nesses animais, que no grupo placebo. Os autores concluíram que o alendronato não influenciou o reparo ósseo nas condições estudadas. No nosso estudo não houve diferença estatisticamente significativa na quantidade de osso neoformado nos grupos A1 e A2, em ambos períodos de observação, e os grupos A1 e A2 (sete e 21 dias) também não se diferenciaram do grupo C de sete dias. Podemos concluir, que o alendronato, na dose utilizada influenciou negativamente o reparo ósseo, prejudicando-o. Dados semelhantes foram observados por Fernandes³⁵ (2005), demonstrando que o alendronato retardou a reparação óssea de defeitos cirúrgicos realizados em fêmures de ratos. No nosso estudo, não houve diferença, também, no processo de neoformação óssea, quando se variou a quantidade de alendronato (1mol e 2moles) no interior do defeito ósseo. Yafee et al.¹⁴¹⁻² (1995 e 1997) avaliaram em dois experimentos distintos o efeito local do alendronato, aplicado topicamente na mandíbula de ratos, após execução de um retalho mucoperiosteal de espessura total. No primeiro estudo, o alendronato não inibiu a reabsorção que ocorre após o deslocamento do retalho tecidual. Na segunda pesquisa, os autores modificaram a dose e o modo de aplicação (uso de esponja cirúrgica) e obtiveram melhores resultados, concluindo que a liberação local do bisfosfonato reduziu significativamente a reabsorção óssea. Silva¹¹⁸ (2000) administrou doses variadas de alendronato, por via oral, em ratas ovariectomizadas com defeitos cirúrgicos em tíbias, e percebeu que a ação do medicamento dependia da dose administrada. Baseado nesses estudos e nas propriedades conhecidas do alendronato no controle da reabsorção óssea, sugerimos que, talvez, obtivéssemos melhores resultados se modificássemos a forma de aplicação e a dose do

medicamento. Tais alterações poderão ser avaliadas em futuras pesquisas. Reddy & Kumar⁹⁶ (2005) utilizaram, por exemplo, alendronato apresentado na forma de gel no tratamento de lesões ósseas periodontais, em humanos. A escolha de um possível veículo para o alendronato deve se basear em suas propriedades químicas, pois ele é solúvel em água, muito pouco solúvel em polietilenoglicol e insolúvel em álcool isopropílico (RIBEIRO & VOLPATO⁹⁸, 2005).

Binderman et al.¹⁰ (2000) avaliaram a eficiência da liberação do alendronato, inserido na submucosa da bochecha de ratos, estando essa região distante da área do local da cirurgia periodontal realizada na mandíbula de ratos e observaram diminuição na reabsorção no sítio mandibular. Os autores concluíram que essa eficiência do alendronato se deu pela sua absorção para a corrente sanguínea e rápida deposição no tecido ósseo. O alendronato é removido do plasma e captado rapidamente pelo tecido ósseo (LIN et al.⁷⁰, 1991). Nos sítios ósseos, não ocorre uma distribuição homogênea do medicamento, sendo este mais abundante nos locais de alto *turnover*, mas não existe acúmulo excessivo local do bisfosfonato, sugerindo, então, que o alendronato retido no osso não aumenta a atividade farmacológica daquele recentemente administrado (RODAN et al.¹⁰², 2004). O alendronato pode aumentar a quantidade de osso neoformado numa região, pois reduz o *turnover* ósseo e inibe primeiro o processo de reabsorção óssea, permitindo que a formação de matriz óssea continue. Baseado no descrito acima, pode-se desenvolver uma hipótese que justifique a formação, por vezes, exuberante do tecido extra-cortical subperiosteal presentes nos grupos A1 e A2, principalmente no período de 21 dias. O alendronato foi aplicado localmente no interior do defeito ósseo, mas também se deslocou para o interior do canal medular, atingindo o compartimento vascular da medula óssea, rico em capilares sinusóides, e alcançando, portanto, a corrente sanguínea. O medicamento agiu, então, na periferia óssea, na região do periósteo. Os nossos animais apresentavam

deficiência na produção de estrógenos, exibindo, provavelmente, um alto *turnover* ósseo e, teoricamente, qualquer sítio ósseo poderia sofrer ação do alendronato. No caso, as regiões mais próximas do defeito apresentaram redução na taxa de remodelação óssea induzida pelo medicamento, ocasionando uma neoformação óssea local. Este osso neoformado extra-cortical subperiosteal foi encontrado, também, nos cortes histológicos seriados realizados próximos da região do defeito ósseo e em imagens radiográficas dos fêmures, ainda não descalcificados, notou-se área radiopaca, sugestiva de osso, estendida da periferia da área do defeito cirúrgico até a cortical óssea (dados não apresentados), reforçando a teoria sugerida por nós.

Essa neoformação extra-cortical subperiosteal foi encontrada em outros grupos animais (HA1 e HA2, sete dias), como descrito na análise histológica, mas não tão abundante como nos grupos A1, A2 e A+HA, no período de 21 dias, o que sugeriu ser esta neoformação um resultado da ação do alendronato, mesmo quando este se encontrava associado a hidroxapatita.

Há dificuldade em se explicar o porquê da ausência de formação de ponte óssea na maioria dos espécimes do grupo A1 e A2, principalmente após 21 dias, quando o grupo C já exibia fechamento linear do defeito por ponte de osso neoformado. Binderman et al.¹⁰ (2000) perceberam que a dose de alendronato aplicada na região da cirurgia periodontal não causava resultados positivos localmente, mas provocava efeitos benéficos no sítio cirúrgico, quando a mesma dose foi administrada à distância. No nosso trabalho, a quantidade de moléculas de alendronato no interior do defeito pode ter exercido um efeito prejudicial na reparação óssea, mas, quando o alendronato se distribuiu, uma menor quantidade de moléculas do medicamento atingiu os sítios mais distantes, favorecendo a neoformação óssea. Garcia-Moreno et al.⁴³ (1998) demonstraram em estudos *in vitro*, que concentrações elevadas de alendronato afetaram a viabilidade dos osteoblastos, prejudicando a

capacidade proliferativa dos mesmos. Weinreb et al.¹³⁸ (1994) também constataram, em animais, que altas doses do medicamento não foram eficientes em controlar a perda óssea na periodontite experimental. A dose do material aplicado no defeito ósseo de nossos animais poderia ter exercido essa ação, prejudicando a neoformação óssea. Entretanto, a formação de trabéculas no interior do canal fica difícil de explicar com essa teoria, a não ser que esse tipo de neoformação não seja decorrente da ação do alendronato, já que ela ocorreu também em outros grupos, ou tais trabéculas podem ter começado a serem formadas em pontos mais distantes da área do defeito e acabaram evoluindo para o interior do canal medular.

A hidroxiapatita é um substituto ósseo amplamente pesquisada na área clínica médico-odontológica (MEHLISH et al.⁷⁹, 1988; COLLINS²¹, 1989; MEHLISCH et al.⁷⁸, 1989; SCHWARTZ & RELI¹¹⁵, 1990; ARTZI et al.⁵, 2001; HALLMAN & ZETTERQVIST⁴⁹, 2004; SINGH et al.¹²¹, 2004). Em trabalhos experimentais, esse biomaterial foi empregado em diversos animais. Alper et al.² (1989) aplicaram hidroxiapatita derivada de corais em defeitos ósseos realizados em tíbias de ratos. Rosa et al.¹⁰⁴ (1995) e Boeck et al.¹³ (1999) inseriram hidroxiapatita granular ou em partículas em alvéolos de ratos. Rosa et al.¹⁰⁵ (1998) implantaram hidroxiapatita em arcos zigomáticos de ratos. Nesses trabalhos, os grupos que receberam hidroxiapatita exibiram uma menor quantidade de osso neoformado, quando comparado ao grupo controle, durante o tempo de estudo. Figueiredo et al.³⁷ (2001) notaram que o grupo tratado com cerâmica de hidroxiapatita, inserida em defeitos femurais de coelhos, mostrou um tecido ósseo neoformado mais imaturo que o do controle. Franco et al.⁴¹ (2001) constataram, que após implantar hidroxiapatita sintética pura associada ao colágeno ou à lipossoma em tíbias de cães, a reparação do defeito ficou restrita, após trinta dias, a formação de tecido de granulação no grupo hidroxiapatita/colágeno, caracterizando retardo no processo de cicatrização. Nós obtivemos resultados contrários aos

desses autores. A hidroxiapatita utilizada por nós, caracterizada como absorvível e microgranular, não provocou atraso na neoformação óssea no defeito cirúrgico e, ao contrário, favoreceu a reparação óssea. No período de sete dias, houve numericamente maior quantidade de osso no grupo HA2, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre esse grupo, o grupo HA1 e todos os demais. Na análise histológica de sete dias, HA1 e HA2 apresentaram-se em estágios de reparação mais avançados que os demais grupos. O defeito ósseo já apresentava inúmeras trabéculas imaturas com osteócitos e osteoblastos volumosos. No período de 21 dias, a quantidade de osso neoformado não diferiu estatisticamente entre os grupos HA1 e C. Já o grupo HA2 apresentou os melhores resultados na histomorfometria, com diferença estatisticamente significativa, quando comparado a todos os demais grupos. No nosso estudo, a maior quantidade de hidroxiapatita (2moles) favoreceu a formação de trabéculas ósseas. Assim, reafirmamos as conclusões de autores como Thorwarth et al.¹³¹, que a hidroxiapatita apresenta as características esperadas para um bom substituto ósseo.

Esses bons resultados obtidos com a hidroxiapatita estão baseados em suas propriedades biológicas. Franco et al.⁴¹ (2001) identificaram grânulos de hidroxiapatita, após sessenta dias, no tecido conjuntivo adjacente ao defeito ósseo cirúrgico e tal material estava encapsulado, não provocando reação de tipo corpo estranho, reforçando a biocompatibilidade do material. Lew et al.⁶⁷ (1997) aplicaram hidroxiapatita em defeitos realizados em calota canina. Baslé et al.⁸ (1993) trabalharam com hidroxiapatita bovina na reparação óssea em coelhos. Em ambos trabalhos, a hidroxiapatita se apresentou como um efetivo anteparo para a neoformação óssea (propriedade da osteocondução). Tieliewuhan et al.¹³² (2004); Xie et al.¹⁴⁰ (2004) e Simon et al.¹²⁰ (2005) detectaram, em estudos com cultura de osteoblastos, que a hidroxiapatita pura ou na superfície de implantes induziu a proliferação celular, assim como a síntese de matriz orgânica. Li et al.⁶⁹ (2005)

desenvolveram um compósito com hidroxiapatita associada ao quitosano e ao testá-lo, *in vitro*, observaram que o mesmo era bioativo, pois permitia o depósito superficial de apatitas semelhantes as do tecido ósseo. A hidroxiapatita em nosso trabalho foi perdida após o processo de descalcificação, mas encontramos, no período de sete dias numerosos espaços vazios, que possivelmente eram ocupados pelos grânulos do biomaterial, rodeados por células volumosas, interpretadas por nós como osteogênicas. Não encontramos material osteóide associado a esses espaços, mas no período de 21 dias houve formação de inúmeras trabéculas ósseas em HA1 e HA2, não havendo mais a existência desses espaços vazios sugestivos de imagem negativa da hidroxiapatita. Esse biomaterial também não induziu a formação de granuloma de corpo estranho e, desse modo, a hidroxiapatita utilizada nesse trabalho apresentou-se biocompatível e osteocondutora. Esta hidroxiapatita possuía pequenas dimensões (grânulos de 0,25-1mm) e era absorvível. Nosso resultado diferiu de Carvalho et al.¹⁸ (1993) e Dalkyz et al.²⁵ (2000), que justificaram a não absorção do material pela dimensão do mesmo. Os grupos HA1 e HA2 foram os que menos apresentaram infiltrado inflamatório no segundo período de estudo e nossos resultados diferiram daqueles relatados por Brandão et al.¹⁴ (2002), que observaram infiltrado inflamatório intenso associado a hidroxiapatita absorvível, de mesma marca comercial e com dimensões idênticas às empregadas nesse estudo.

Sabokbar et al.¹⁰⁸ (2001), com estudos em cultura de macrófagos e Ferreira et al.³⁶ (2004), utilizando hidroxiapatita microgranular no preenchimento de defeitos ósseos em crânio de ratos, mostraram que os grânulos desse biomaterial, quando muito pequenos, tinham a tendência a se aglomerar e formarem grandes estruturas, conduzindo, no vivo, a formação de granuloma do tipo corpo estranho, prejudicando a absorção do material e, conseqüentemente, a neoformação óssea. Nosso trabalho utilizou hidroxiapatita microgranular,

como Ferreira et al.³⁶ (2004), mas não observamos a formação de grandes espaços anteriormente ocupados por hidroxiapatita, nem a formação de granuloma com células gigantes, e sim uma reparação óssea do defeito cirúrgico no grupo HA2 de 21 dias mais rápida que o controle. Estes dados estão de acordo com Moreira et al.⁸⁵ (2003), que utilizaram hidroxiapatita com a mesma dimensão e marca comercial daquela empregada por nós, em defeitos ósseos de fêmures de ratos.

A hidroxiapatita como revestimento de implantes metálicos tem sido utilizada como veículo para antibióticos e bisfosfonatos, como o alendronato e o ibandronato (YOSHINARI et al.¹⁴⁶, 2001; GANGULI et al.⁴², 2002; KIM et al.⁶², 2005). Ganguli et al.⁴² (2002) relataram que a associação entre alendronato e hidroxiapatita na cobertura dos implantes foi, teoricamente, interessante, pois os bisfosfonatos se ligaram avidamente à hidroxiapatita e inibiram a reabsorção óssea gerada por pressões excessivas sobre os implantes dentários. Os autores alertaram para a verificação se os efeitos inibitórios dos bisfosfonatos sobre osteoclastos continuavam mesmo após a interação com a hidroxiapatita. Em nosso trabalho não deve ter ocorrido uma reação química entre alendronato e hidroxiapatita, pois as duas substâncias se apresentavam na forma de pó e foram misturadas no momento do estudo. O grupo A+HA, no período de sete dias, apresentou-se histologicamente semelhante aos grupos C, Am, A1 e A2; com pequena formação de tecido ósseo. Não houve diferença estatística entre o grupo A+HA e os outros grupos. No período de 21 dias, ocorreu uma grande variação dos espécimes em relação à formação de osso no defeito ósseo, o que fez que não houvesse diferença estatística significativa entre os períodos de sete e 21 dias para o grupo A+HA. O grupo C de 21 dias apresentou maior neoformação óssea, com significado estatístico, que o grupo A+HA de 21 dias. Concluímos, então, que a associação alendronato e hidroxiapatita prejudicou o processo de reparo ósseo em fêmures de ratas ovariectomizadas. A análise estatística entre os grupos de 21 dias

mostrou que não houve diferença entre os grupos A1 e A+HA (1mol + 1mol), mas estes foram diferentes do grupo HA1, em relação a neoformação óssea, o que nos leva a concluir que o alendronato, associado ou não à hidroxiapatita, prejudicou a reparação óssea, mas a hidroxiapatita isolada não, pois o grupo HA1 foi estatisticamente igual ao grupo C de 21 dias. Finalmente, podemos afirmar que o alendronato prejudicou a ação osteocondutora da hidroxiapatita, sendo esta característica mais evidente em alguns espécimes do grupo A+HA, já que houve variação no processo de neoformação óssea dentro desse grupo.

Fernandes³⁵ (2005) também não observou ação positiva da associação alendronato e hidroxiapatita, aplicada localmente, na reparação óssea de fêmures de ratas. Anteriormente, Fernandes³⁴ (2002) estudou a reparação óssea em mandíbula de coelhos aplicando hidroxiapatita no interior do defeito ósseo e administrando alendronato por via oral, e constatou, também, que essa associação não favoreceu a reparação óssea. Mochida et al.⁸⁴ (2002) inseriram próteses de titânio revestidas com hidroxiapatita, nos fêmures de cães, e administraram o alendronato, por via oral, para metade dos animais. Os autores não perceberam diferença estatística entre os grupos e concluíram que o alendronato não afetou a neoformação óssea na área ao redor do implante. Já Kurth et al.⁶⁵ (2005) inseriram implantes de titânio cobertos por hidroxiapatita em fêmures de ratas ovariectomizadas e administraram o bisfosfonato (ibandronato) por via subcutânea, em alguns animais. Os melhores resultados dos autores, em relação à osteointegração, ocorreram nos grupos medicados com ibandronato.

A maioria dos animais apresentou neoformação óssea extra-cortical subperiosteal nos grupos A+HA do período de sete e 21 dias. Esse tipo de osso apareceu de forma mais definida nos grupos A1 e A2, principalmente no período de 21 dias, e, portanto, deve ser resultado do efeito do alendronato aplicado localmente, mesmo estando o bisfosfonato na presença da hidroxiapatita no interior do defeito ósseo. No

período de sete dias, além dos grupos A1, A2 e A+HA, a neoformação óssea extra-cortical subperiosteal apareceu em alguns espécimes dos grupos HA1 e HA2, mas esse osso estava ausente nos animais no período de 21 dias, provavelmente porque esse tecido ósseo foi remodelado. Isso reforça a possível ação do alendronato na indução dessa formação tecidual.

A ação local da associação alendronato mais hidroxiapatita já foi abordada na literatura em outros trabalhos. Meraw & Reeve⁸¹ (1999) e Meraw et al.⁸² (1999) analisaram o efeito de implantes de titânio superficialmente cobertos por hidroxiapatita e alendronato, obtendo aumento na taxa de formação óssea na interface implante-osso. Esses trabalhos forneceram indícios que essa associação pode ser favorável no processo de neoformação óssea, principalmente em situações de desequilíbrio no metabolismo ósseo, como ocorre em ratas ovariectomizadas. O alendronato possui a função de controlar o *turnover* ósseo e, conseqüentemente, diminui a reabsorção e aumenta a produção de tecido ósseo pelos osteoblastos, provocando até maior grau de mineralização nesse tecido (RODAN & FLEISCH¹⁰⁰, 1996). A hidroxiapatita é um material biocompatível e osteocondutor, como demonstrado por nós e outros autores. A associação desses materiais é, teoricamente, ideal para o reparo de defeitos cirúrgicos, sendo até mais interessante o emprego dessa associação em casos de osteopenia/osteoporose. Isso poderá ser confirmado, em próximas pesquisas, modificando a dose e a forma de apresentação do bisfosfonato, utilizando ainda o modo de aplicação local ou alterando a forma de administração do medicamento.

Finalmente, o que nos chamou atenção foi a ausência de fechamento do defeito por tecido ósseo na maioria dos animais dos grupos A1, A2 e A+HA, após 21 dias, e a existência da neoformação óssea extra-cortical subperiosteal, que, por vezes, circundava toda a superfície do fêmur. Em um animal de cada grupo A1 e A2 (21 dias), tal

neoformação invadiu a área do defeito ósseo, levando, então, ao fechamento do mesmo, mas, pelo que nos pareceu, esses foram eventos atípicos, que necessitam ser mais estudados.

Existem evidências, baseadas nesse modelo experimental, que o alendronato sódico induziu neoformação óssea e, em estudos posteriores, haverá a necessidade de se tentar direcionar tal ação do medicamento para a região do defeito, o que poderá resultar no fechamento do mesmo por tecido ósseo.

7 CONCLUSÃO

Baseados nos resultados obtidos nesse trabalho, podemos concluir que:

- a) não houve diferença entre os grupos experimentais no reparo ósseo nos fêmures de ratas ovariectomizadas após sete dias de observação;
- b) o amido não prejudicou, nem favoreceu a reparação óssea nos animais, podendo ser utilizado como excipiente em outros trabalhos científicos;
- c) o alendronato sódico (1mol e 2moles) prejudicou a neoformação óssea no interior do defeito ósseo, quando utilizado isoladamente, ou associado à hidroxiapatita;
- d) a hidroxiapatita microgranular utilizada mostrou-se biocompatível e osteocondutora e se mostrou mais eficiente, no reparo ósseo, quando utilizamos na concentração molar de dois moles.
- e) evidenciou-se nos grupos A1, A2 e A+HA, nos períodos de sete e 21 dias, a presença de neoformação óssea extra-cortical subperiosteal.

8 REFERÊNCIAS*

- 1 ALMEIDA, J.D. et al. Estudo da reparação óssea em mandíbula de ratos. **Pós-Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos**, v.3, n.1, p.49-53, jan./jun. 2000.
- 2 ALPER, G. et al. Osteogenesis in bone defects in rats: the effects of hydroxyapatite and demineralized bone matrix. **Am J Med Sci**, v.298, n.6, p.371-6, Dec. 1989.
- 3 ALTUNDAL, H.; GURSOY, B. The influence of alendronate on bone formation after autogenous free bone grafting in rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.99, n.3, p.285-91, Mar. 2005.
- 4 ALTUNDAL, H.; GÜVENER, Ö. The effect of alendronate on resorption of the alveolar bone following tooth extraction. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.33, n.3, p.286-93, Apr. 2004.
- 5 ARTZI, Z. et al. Histopathological morphometric evaluation of 2 different hydroxyapatite-bone derivatives in sinus augmentation procedures: a comparative study in humans. **J Periodontol**, v.72, n.7, p.911-20, July 2001.

* Baseado em:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Rio de Janeiro. **Informação e documentação: referências, elaboração, NBR6023**. Rio de Janeiro, 2002. 23p.

- 6 BAKER, P.J. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. **Microbes Infect**, v.2, n.10, p.1181-92, Aug. 2000.
- 7 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.
- 8 BASLÉ, M.F. et al. Cellular response to calcium phosphate ceramics implanted in rabbit bone. **J Mater Sci Mater Med**, v.4, p.273-80. 1993.
- 9 BAUER, D.C. et al. Change in bone turnover and Hip, non-spine , and vertebral fracture in alendronate-treated women: the fracture intervention trial. **J Bone Miner Res**, v.19, n.5, p.1250-8, Aug. 2004.
- 10 BINDERMAN, I.; ADUT, M.; YAFFE, A. Effectiveness of local delivery of alendronate in reducing alveolar bone loss following periodontal surgery in rats. **J Periodontol**, v.71, n.8, p.1236-40, Aug. 2000.
- 11 BISWAS, P.N. WILTON, L.V.; SHAKIR, S.A.W. Pharmacovigilance study of alendronato in England. **Osteoporos Int**, v.14, n.6, p.507-14, Jun. 2003.
- 12 BLUMEL, J.E. et al. Alendronate daily, weekly in conventional tablets and weekly in enteric tablets: preliminary study on the effects in bone turnover markers and incidence of side effects. **J Obstet Gynaecol**, v.23, n.3, p.278-81, May 2003.

- 13 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.
- 14 BRANDÃO, A.C. et al. Histomorphometric analysis of rat alveolar wound healing with hydroxyapatite alone or associated to BMPs. **Braz Dent J**, v.13, n.3, p.147-54, 2002.
- 15 BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo patologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1328p.
- 16 BRAZ, F. et al. Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos. **Acta Cir Bras**, v.18, n.1, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/acb>. Acesso em: 23 mar. 2006.
- 17 BREW, M.C.; FIGUEIREDO, J.A.P. **Histologia geral para Odontologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2003. 148p.
- 18 CARVALHO, P.S.P.; GARCIA JUNIOR, I.R.; SANCHES, M.G. Estudo comparativo entre as hidroxiapatitas: osteosynt e HA-40. **Rev Gaúcha Odontol**, v.41, n.6, p.330-2, nov./dez. 1993.
- 19 CHEN, X. et al. Characterization of a chronic in an internally-stabilized defect in the rat femur. **J Orthop Res**, v.23, n.4, p.816-23, July 2005.
- 20 CHISTOLINI, P. et al. Biochemical evaluation of cell-loaded and cell-free hydroxyapatite implants for the reconstruction of segmental bone defects. **J Mater Sci Mater Med**, v.10, n.12, p.739-42, Dec. 1999.

- 21 COLLINS, T.A. Use of collagen tubes containing particulate hydroxylapatite for augmentation of the edentulous atrophic maxilla. **J Oral Maxillofac Surg**, v.47, n.2, p.137-41, Feb. 1989.
- 22 COSTA, C. de A. et al. In vivo characterization of titanium implants coated with synthetic hydroxyapatite by electrophoresis. **Braz Dent J**, v.16, n.1, p.75-81, 2005.
- 23 CRANNEY, A. Treatment of postmenopausal osteoporosis. **BMJ**, v.327, n.16, p.355-6, Aug. 2003.
- 24 Da PAZ, L.H.B.C. et al. Effect of 17β -estradiol or alendronate on the bone densitometry, bone histomorphometry and bone metabolism of ovariectomized rats. **Braz J Med Biol Res**, v.34, n.8, p.1015-22, Aug. 2001.
- 25 DALKYZ, M. et al. Evaluation of the effects of different biomaterials on bone defects. **Implant Dent**, v.9, n.3, p.226-35. 2000.
- 26 Di SILVIO, L.; DALBY, M.; BONFIELD, W. *In vitro* response of osteoblasts to hydroxyapatite-reinforced polyethylene composites. **J Mater Sci Mater Med**, v.9, n.12, p.845-8, Dec. 1998.
- 27 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.
- 28 DUONG, L.T.; RODAN, G.A. Regulation of osteoclast formation and function. **Rev Endocr Metab Disord**, v.2, n.1, p.95-104, Jan. 2001.

- 29 EASTELL, R. Management of osteoporosis due to ovarian failure. **Med Pediatr Oncol**, v.41, n.3, p.222-7, Sept. 2003.
- 30 ENSRUD, K.E. et al. Randomized trial of effect of alendronate continuation versus discontinuation in women with low BMD: results from the fracture intervention trial long-term extension. **J Bone Miner Res**, v. 19, n.8, p.1259-69, Aug. 2004.
- 31 EVIÖ, S. et al. Effects of alendronate and hormone replacement therapy, alone and in combination, on bone mass and markers of turnover in elderly women with osteoporosis. **J Clin Endocrinol Metab**, v.88, n.2, p.626-31, 2004.
- 32 FAYAD, M.V.L. **Reparação óssea sob ação de duas formulações de bifosfonatos**: 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.
- 33 FERNANDES, P.A.; PIRES, M.S.; GOUVÊA, A.P. Esofagite ulcerativa associada ao uso de alendronato sódico: achados histopatológicos e endoscópicos. **Arq Gastroenterol**, v.39, n.3, p.173-6, jul./set. 2002.
- 34 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.

- 35 FERNANDES, R.G. **Estudo da ação local do alendronato sódico, da hidroxiapatita e da associação do alendronato sódico com a hidroxiapatita, no reparo ósseo de fêmures de ratos.** 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.
- 36 FERREIRA, G.R. et al. Lack of repair of rat skull critical size defect treated with bovine morphometric protein bound to microgranular bioabsorbable hydroxyapatite. **Braz Dent J**, v.15, n.3, p.175-80, 2004.
- 37 FIGUEIREDO, A.S. et al. Comparação entre hidroxiapatita de coral e enxerto ósseo autógeno em coelhos. **Acta Cir Bras**, v.16, n.3, jul./set. 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/acb>. Acesso em: 23mar. 2006.
- 38 FISHER, J.E. et al. Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption and kinase activation *in vitro*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.96, n.1, p.133-8, Jan. 1999.
- 39 FLEISCH, H. Bisphosphonates: mechanisms of action. **Endocr Rev**, v.19, n.1, p.80-100, Feb. 1998.
- 40 FRAME, J.W. A composite of porous calcium dehydrate and cyanocrylate as a substitute for autogenous bone. **J Oral Surg**, v.38, n.4, p.251-6, Apr. 1980.

- 41 FRANCO, K.L. et al. Hidroxiapatita sintética pura, hidroxiapatita associada ao colágeno e hidroxiapatita associada ao lipossoma como substitutos ósseos em defeitos provocados na tíbia de cães: aspectos da osteointegração à microscopia de luz transmitida. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.53, n.4, p.1-7, ago. 2001.
- 42 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.
- 43 GARCÍA-MORENO, C. et al. Effect of alendronate on culture normal human osteoblasts. **Bone**, v.22, n.3, p. 233-9, Mar. 1998.
- 44 GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de histologia em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 456p.
- 45 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.
- 46 GOSAIN, A.K. et al. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF- β isoforms. **Plast Reconstr Surg**, v.106, n.2, p. 360-72, Aug. 2000.
- 47 GREENSPAN, S.L.; RESNICK, N.M.; PARKER, R.A. 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.

- 48 HALASY-NAGY, J.M.; RODAN, G.A.; RESZKA, A.A. Inhibition of bone resorption by alendronate and risedronate does not require osteoclast apoptosis. **Bone**, v.29, n.6, p.553-9, Dec. 2001.
- 49 HALLMAN, M.; ZETTERQVIST, L. A 5 year prospective follow-up study of implant-supported fixed prostheses in patients subjected to maxillary sinus floor augmentation with an 80:20 mixture of bovine hydroxyapatite and autogenous bone. **Clin Implant Dent Relat Res**, v.6, n.2, p.82-9, 2004.
- 50 HARKNESS, J.E.; WAGNER, J.E. **Biologia e clínica de coelhos e roedores**. São Paulo: Roca, 1993. p. 49-55, 104-7.
- 51 HAVLIK, R.J. Hydroxyapatite. **Plastic Reconstr Surg**, v.110, n.4, p.1176-9, Sept. 2002.
- 52 HORWITZ, M.; STEWART, A.; GREENSPAN, S.L. Sequential parathyroid hormone/alendronate therapy for osteoporosis-robbing Peter to pay Paul? **J Clin Endocrinol**, v.85, n.6, p.2127-8, June 2000. (Editorial).
- 53 IWAMOTO, J. et al. Comparative effects of treatment with etidronate and alendronate on bone resorption, back pain, and activities of daily living in elderly women with vertebral fractures. **Keio J Med**, v. 52, n.4, p.230-5, Dec. 2003.
- 54 JAGER, M. et al. The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies: implant evolution and surgical technique on a rat's femur. **Biomed Tech**, v.50, n.5, p.137-42, May 2005. Disponível em: <http://www.biomedical-engineering-online.com>. Acesso em: 06 jul. 2006.

- 55 JAIME, A.P.G. et al. Influência da administração local de alendronato sódico no reparo ósseo em calvária de ratas ovariectomizadas. **Cienc Odontol Bras**, v.8, n.2, p.70-9, abr./jun. 2005.
- 56 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.
- 57 JILKA, R.L. et al. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. **Science**, v.257, n.5066, p.88-91, July 1992.
- 58 JUNQUEIRA, J.C. et al. Experimental candidosis and recovery of *Candida albicans* from the oral cavity of ovariectomized rats. **Microbiol Immunol**, v.49, n.3, p.199-207, 2005.
- 59 JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In:____. **Histologia básica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap.8, p.136-53.
- 60 KALU, D.N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Miner**, v.15, n.3, p.175-91, Dec. 1991.
- 61 KAWATA, T. et al. Effect of alendronato on osteoclast differentiation and bone volume in transplanted bone. **Exp Anim**, v.53, n.1, p.47-51, 2004.
- 62 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.

- 63 KOSTOPOULOS, L.; KARRING, T. Role of periosteum in the formation of jaw bone. An experient in the rat. **J Clin Periodontol**, v.22, n.3, p.247-54, Mar. 1995.
- 64 KULAK, C.; BILEZIBIAN, J. Bisfosfonatos: características e utilização na osteoporose. In: BANDEIRA, F. et al. **Osteoporose**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. p.351-72.
- 65 KURTH, A.H.A. et al. The bisphosphonate ibandronate improves implant integration in osteopenic ovariectomized rats. **Bone**, v.37, n.2, p.204-10, Aug. 2005.
- 66 LeGEROS, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clin Orthop Relat Res**, v.1, n.395, p.81-98, Feb. 2002.
- 67 LEW, D. et al. Repair of craniofacial defects with hydroxyapatite cement. **J Oral Maxillofac Surg**, v.55, n.12, p.1441-9, Dec. 1997.
- 68 LIBERMAN, U.A. et al. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. **N Engl J Med**, v.333, n.22, p.1437-43, Nov. 1995.
- 69 LI, Z. et al. Preparation and in vitro investigation of chitosan/nano-hydroxyapatite composite used as bone substitute materials. **J Mater Sci Mater Med**, v.16, n.3, p.213-9, Mar. 2005.
- 70 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.

- 71 LITTLE, D.G. et al. Manipulation of the anabolic and catabolic responses with OP-1 and zoledronic acid in a rat critical defect model. **J Bone Miner Res**, v.20, n.11, p.2044-52, July 2005.
- 72 LUKLINSKA, Z.B.; BONFIELD, W. Morphology and ultrastructure of the interface between hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composite implant and bone. **J Mater Sci Mater Med**, v.8, n.6, p.379-83, June 1997.
- 73 LUSTOSA-PEREIRA, G.A. et al. Evaluation of the topical effect of alendronate on the root surface of extracted and replanted teeth. Microscopic analysis on rats'teeth. **Dent Traumatol**, v.22, n.1, p.30-6, Feb. 2006.
- 74 MAKKONEN, N et al. Contrasting effects of alendronate and clodronate on RAW 264 macrophages: the role of a bisphosphonate metabolite. **Eur J Pharm Sci**, v.8, n.2, p.109-118, May 1999.
- 75 MANOLOGAS, S.C. Bone marrow, clastic, and blastic cell system: quo vadis? **Calcif Tissue Int**, v.56, suppl. 1, p.S52-3. 1995.
- 76 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.
- 77 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. (Abstract). Disponível em: <http://www.kurtis.it/en/mags/aging/generalinfo.cfm>. Acesso em: 06 jul. 2006.

- 78 MEHLISCH, D.R.; AUSTIN, D.; HOUSTON, T. Collagen/hydroxylapatite implant for augmenting deficient alveolar ridges: 24-month clinical and histologic summary. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.68, n.4, p.505-16, Oct. 1989.
- 79 MEHLISCH, D.R. et al. Collagen/hydroxylapatite implant for augmenting deficient alveolar ridges: twelve-month clinical data. **J Oral Maxillofac Surg**, v.46, p.839-46. 1988.
- 80 MENEZES, A.M.A. et al. Effect of sodium alendronate on alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v.76, n.11, p.1901-9, Nov. 2005.
- 81 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.
- 82 MERAW, S.J.; REEVE, C.M.; WOLLAN, P.C. Use of alendronate in peri-implant defect regeneration. **J Periodontol**, v.40, n.2, p.151-8, Feb. 1999.
- 83 MIYAJI, T. et al. Alendronate inhibits bone resorption at the bone-screw interface. **Clin Orthop Relat Res**, n.430, p.195-201, Jan. 2005.
- 84 MOCHIDA, Y. et al. Alendronate does not inhibit early bone apposition to hydroxyapatite – coated total joint implants. **J Bone Joint Surg Am**, v.84-A, n.2, p. 226-35, Feb. 2002.

- 85 MOREIRA, A.S.B. et al. Estudo experimental da influência das dimensões dos grânulos de hidroxiapatita na interação óssea. **Acta Ortop Bras**, v.11, n.4, p. 240-50, out./dez. 2003.
- 86 MOREIRA, M.S. et al. Cytotoxicity analysis of alendronate on cultured endothelial cells and subcutaneous tissue: a pilot study. **Dent Traumatol**, v.21, n.6, p.329-35, Dec. 2005.
- 87 MUNDY, G.R. Role of cytokines in bone resorption. **J Cell Biochem**, v.53, n.4, p.296-300, Dec. 1993.
- 88 NISHIKAWA, M. et al. Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. **Bone**, v.18, n.1, p.9-14, Jan. 1996.
- 89 ORWOLL, E. et al. Alendronate for the treatment of osteoporosis in mem. **N Engl J Med**, v.343, n.9, p.604-10, Aug. 2000.
- 90 OZDEMIR, F.; RODOPLU, M. Benefit period using alendronato to increase bone mineral density in women with osteoporosis. **Chin Med J**, v.118, n.5, p.383-90, Mar. 2005.
- 91 PEREIRA, A.C. **Estudo comparativo do processo de reparação óssea em ratos normotensos e hipertensos (SHR)**. 2004. 91p. 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, 2004.
- 92 PETER, C.P. et al. Effect of alendronate on fracture healing and bone remodeling in dogs. **J Orthop Res**, v.14, n.1, p.74-9, Jan. 1996.

- 93 PIETSCHMANN, P. et al. The effect of alendronate on cytokine production, adhesion molecule expression, and transendothelial migration of human peripheral blood monocuclear cells. **Calcif Tissue Int**, v.63, n.4, p.325-30, Oct. 1998.
- 94 POMA, A.; GUTIÉRRES, G.; CASAS, J. Bisfosfonatos: aplicaciones actuales en osteoporosis y cáncer. **An Fac Med**, v.60, n.1, p.61-5, 1999. Disponível em: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/anales/V60_n1/biosfonatos.htm. Acesso em: 23 mar. 2006.
- 95 PYTLIK, M. et al. Effect of concurrent administration of alendronate sodium and retinol on development of changes in histomorphometric parameters of bones induced by ovariectomy in rats. **Pol J Pharmacol**, v.56, n.5, p.571-9, Sept./Oct. 2004.
- 96 REDDY, G.T.; KUMAR, T.M. Formulation and evaluation of alendronato sodium gel for the treatment of bone resorptive lesions in periodontitis. **Drug Deliv**, v.12, n.4, p.217-22, Jul./Aug. 2005. Acesso em: <http://www.freefulltext.com/D.htm>. Disponível em: 06 jul. 2006.
- 97 REDDY, M.S. et al. Alendronate treatment of naturally-occurring periodontitis in beagles dogs. **J Periodontol**, v.66, n.3, p.211-7, Mar. 1995.
- 98 RIBEIRO, A.F.; VOLPATO, N.M. Alendronato de sódio: metodologia para análise quantitativa. **Quim Nova**, v.28, n.5, p.852-8, jun. 2005.
- 99 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.

- 100 RODAN, G.A.; FLEISCH, H.A. Bisphosphonates: mechanism of action. **J Clin Invest**, v.97, n.12, p.2692-6, June 1996.
- 101 RODAN, G.A.; MARTIN, T.J. Therapeutic approaches to bone diseases. **Science**, v.289, n.1, p.1508-14, Sept. 2000.
- 102 RODAN, G. et al. Bone safety of long-term bisphosphonate treatment. **Curr Res Med Opin**, v.20, n.8, p.1291-300, Aug. 2004.
- 103 ROGERS, M.J. et al. Cellular and molecular mechanisms of action bisphosphonates. **Cancer**, v.88, n.15, p.2961-78, June 2000.
- 104 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.
- 105 ROSA, F.P. et al. Avaliação histológica de três diferentes tipos de hidroxiapatitas, implantadas em arco zigomático de rato. **Rev Odontol UNESP**, v.27, n.2, p.495-508, jun./dez. 1998.
- 106 RUBIN, E., FARBER, J.L. **Patologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1564p.
- 107 RUSSELL, R.G.G; ROGERS, M.J. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. **Bone**, v.25, n.1, p.97-106, July 1999.
- 108 SABOKBAR, A. et al. Hydroxyapatite particles are capable of inducing osteoclast formation. **J Mater Sci Mater Med**, v.12, n.8, p.659-64, Aug. 2001.

- 109 SAHNI, M. et al. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. **J Clin Invest**, v.91, n.5, p.2004-11, May 1993.
- 110 SALATA, L.A.; CRAIG, G.T.; BROOK, I.M. Bone healing following the use of hydroxyapatite or ionomeric bone substitutes alone or combined with a guided bone regeneration technique: an animal study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.13, n.1, p.44-51, Jan./Feb. 1998.
- 111 SAMBROOK, P. Once weekly alendronate. **Drugs Today (Barc)**, v.39, n.5, p.339-46, May 2003.
- 112 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.
- 113 SATO, M. et al. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. **J Clin Invest**, v.88, n.6, p.2095-105, Dec. 1991.
- 114 SAUNDERS, Y. et al. Systematic review of bisphosphonates for hypercalcaemia of malignancy. **Palliat Med**, v.18, n.5, p.418-31, July 2004.
- 115 SCHWARTZ, H.C.; RELLE, R.J. Extraoral placement of a subperiosteal tissue expander for reconstruction with hydroxylapatite of the severely atrophic mandibular ridge. **J Oral Maxillofac Surg**, v.48, n.2, p.157-61, Feb. 1990.

- 116 SEEMAN, E.; EISMAN, J.A. Treatment of osteoporosis: why, whom, when and how to treat. **Med J Aust**, v.180, n.15, p.298-303, Mar. 2004.
- 117 SHEN, H.C. et al. Structural and functional healing of critical-size segmental bone defects by transduced muscle-derived cells expressing BMP4. **J Gene Med**, v.6, n.9, p.984-91, Sept. 2004.
- 118 SILVA, C.M.O.M. **Avaliação da ação do alendronato sódico sobre a reparação óssea na ausência dos hormônios ovarianos**. 2000. 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, 2000.
- 119 SILVEIRA, V.A.S. **Efeito das isoflavonas, da terapia de reposição hormonal com estrógeno e da associação de ambos na reparação de defeitos ósseos em ratas ovariectomizadas**. 2004. 140f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2004.
- 120 SIMON, M. et al. Corrosion resistance and biocompatibility of a new porous surface for titanium implants. **Eur J Oral Sci**, v.113, n.6, p.537-45, Dec. 2005
- 121 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.

- 122 SLIWINSKI, L. et al. Effect of administration of alendronate sodium and retinol on the mechanical properties of the femur in ovariectomized rats. **Pol J Pharmacol**, v.56, n.5, p.817-24, Sept./Oct. 2004.
- 123 SOUZA, L.B.; ARCE, W.P.R.; PINTO, L.P. Efeito da hidroxiapatita sintética no processo de reparo e na população de mastócitos em ratos Wistar. **Rev Odontol Ciênc**, v.14, n.27, p.193-212, jun. 1999.
- 124 SPARIDANS, R.W.; TWISS, I.M.; TALBOT, S. Bisphosphonates in bone diseases. **Pharm World Sci**, v.20, n.5, p.206-13, Oct. 1998.
- 125 STRAUS, S.E. Recent advances. Geriatric medicine. **BMJ**, v.322, n.13, p.86-9, Jan. 2001.
- 126 TEITELBAUM, S.L. Bone remodeling and the osteoclast. **J Bone Miner Res**, v.8, suppl.2, p.S523-5, Dec. 1993.
- 127 TEITELBAUM, S.L. Bone resorption by osteoclast. **Science**, v.289, n.5484, p.1504-8, Sept. 2000.
- 128 TEN CATE, A.R. Osso. In:_____. **Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função**. 5.ed. Trad. A.B. Moleri. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap.7, p.101-22.
- 129 TEÓFILO, J.M. et al. Comparison between two experimental protocols to promote osteoporosis in the maxilla and proximal tibia of female rats. **Pesq Odontol Bras**, v.17, n.4, p.302-6, Oct./Dec. 2003.

- 130 TETI, A.; MARCHISIO, P.C.; ZALLONE, A.Z. Clear zone in osteoclast function: role of podosomes in regulation of bone-resorbing activity. **Am J Physiol**, v.261, n.30, p.C1-7, July 1991.
- 131 THORWARTH, M. et al. Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticulate hydroxyapatite. **J Oral Maxillofac Surg**, v.63, n.11, p.1626-33, Nov. 2005.
- 132 TIELIEWUHAN, Y. et al. Osteoblast proliferation behaviour and bone formation on and in CO₃apatite-collagen sponges with a porous hydroxyapatite frame. **Dent Mater J**, v.23, n.3, p.258-64, Sept. 2004.
- 133 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.
- 134 TOYRAS, A. et al. Inhibition of mevalonate pathway is involved in alendronate-induced cell growth inhibition, but not in cytokine secretion from macrophages in vitro. **Eur J Pharm Sci**, v.19, n.4, p.223-30, July 2003.
- 135 UDAGAWA, N. Mechanisms involved in bone resorption. **Biogerontology**, v.3, n.1-2, p.79-83. 2002.
- 136 Van BEEK, E. et al. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit isopentenyl pyrophosphate isomerase/farnesyl pyrophosphate synthase activity with relative potencies corresponding to their antiresorptive potencies in vitro and in vivo. **Biochem Biophys Res Commun**, v.255, n.2, p.491-4, Feb. 1999.

- 137 VITTÉ, C.; FLEISCH, H.; GUENTHER, L.H. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. **Endocrinology**, v.137, n.6, p.2324-33, June 1996.
- 138 WEINREB, M. et al. Histomorphometrical analysis of the effects of the bisphosphonate alendronate on bone loss caused by experimental periodontitis in monkeys. **J Periodont Res**, v.29, n.1, p.35-40, Jan. 1994.
- 139 WRONSKI, T.J.; CINTRON, M.; DANN, L.M. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. **Calcif Tissue Int**, v.43, n.3, p.179-83, Sept. 1988.
- 140 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.
- 141 YAFFE, A. et al. The effect of bisphosphonate on alveolar resorption following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. **J Periodontol**, v.66, n.11, p.999-1003, Nov. 1995.
- 142 YAFEE, 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.
- 143 YAN J.; LIANJIA, Y.; WHITE, F.H. An immunocytochemical study of bone morphogenetic protein in experimental fracture healing of the rabbit mandible. **Chin Med Sci J**, v.9, n.2, p.91-5, June 1994.

- 144 YAO, X.; TAN, S.; JIANG, D. Fabrication of hydroxyapatite ceramics with controlled pore characteristics by slip casting. **J Mater Sci Mater Med**, v.16, n.2, p.161-5, Feb. 2005.
- 145 YOUNG, B.; HEATH, J.W. Tecidos esqueléticos. In:_____ . **Histologia funcional de Wheater**: texto e atlas em cores. Trad. M.C. Engelhardt. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 10, p.172-92.
- 146 YOSHINARI, M. et al. Immobilization of bisphosphonates on surface modified titanium. **Biomaterials**, v.22, n.7, p.709-15, Apr. 2001.
- 147 ZAIDI, M. et al. Osteoclast function and its control. **Exp Physiol**, v.78, n.6, p.721-39, Nov. 1993.

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



CERTIFICADO

Comitê de Ética em Pesquisa-Local

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 009/2005-PA/CEP, sobre “Estudo da reparação óssea em fêmures de ratas ovariectomizadas sob a ação local do alendronato sódico, da hidroxiapatita ou da associação alendronato com a hidroxiapatita”, sob a responsabilidade de **ANTONIO CARLOS VICTO CANETTIERI**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 15 de abril de 2005.



Prof. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

CANETTIERI, A.C.V. **Bone repair in ovariectomized rats femurs under local action of the sodium alendronate, of the hydroxyapatite and of the association alendronate with hydroxyapatite.** 2006. 144f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2006.

ABSTRACT

This work evaluated the action of sodium alendronate, of hydroxyapatite and the association alendronate with hydroxyapatite in the repair of bone defects in ovariectomized rats femurs. Ninety eight animals were divided into seven groups: control (C), starch (Am), alendronate 1mol (A1), alendronate 2moles (A2), hydroxyapatite 1 mol (HA1), hydroxyapatite 2 moles (HA2) and the association alendronate and hydroxyapatite (A+HA). The rats weighing, approximately, 250g were ovariectomized and, after thirty days, bone defects, measuring 2,5mm, were created in the lefts femurs. The bone defects were filled with alendronate, hydroxyapatite or with both, but the group C not received none material, and the group Am, only starch. The animals were sacrificed at seven and 21 days after surgery. Histological and histomorphometric analyses were performed and the results obtained were submitted to statistical analysis. Histologically, the principal differences occurred after 21 days, with the groups C, Am, HA1 and HA2 showing a linear closure of bone defect in every specimen. The most of animals of the groups A1, A2 and A+HA did not show central bone neoformation in bone defects, and there was fibrous connective tissue in this region. After seven days, there was not significance statistical difference among all experimental groups in relation to bone neoformation and, after 21 days, the group HA2 showed the most quantity of new bone formation. Statistically, there were no differences among the groups A1, A2 and A+HA in both studied period. It was concluded that the sodium alendronate, alone or combined with hydroxyapatite, harmed the bone repair in this experimental model and the hydroxyapatite was biocompatible and osteoconductive, with the best results in group HA2.

KEYWORDS: *Bisphosphonates; alendronate; hydroxyapatite; bone regeneration; bone.*

Autorizo a reprodução xerográfica deste trabalho

São José dos Campos, 07 de agosto de 2006

Antonio Carlos Victor Canettieri