

JUCELY APARECIDA DA ROSA

**ESTUDO DA REPARAÇÃO ÓSSEA EM FÊMURES DE
RATAS SOB A AÇÃO LOCAL DO RESIDRONATO DE
SÓDIO**



2011

JUCELY APARECIDA DA ROSA

**ESTUDO DA REPARAÇÃO ÓSSEA EM FÊMURES DE RATAS SOB A
AÇÃO LOCAL DO RESIDRONATO DE SÓDIO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia

Orientador: Prof. Tit. Horácio Faig Leite

São José dos Campos

2011

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2010.

R71e Rosa, Jucely Aparecida da.
Estudo da reparação óssea em fêmures de ratas sob a ação local do
residronato de sódio / Jucely Aparecida da Rosa. - São José dos
Campos: [s.n.], 2011.
75 .f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de
Odontologia de São Jose dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista,
2011.

Orientador: Prof. Tit. Horácio Faig Leite

1. Regeneração óssea. 2. Osso. 3. Bifosfonatos. 4. Residronato. I. Faig
Leite, Horácio. II. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos,
UNESP - Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista “Julio
de Mesquita Filho”. IV. Título

tD12

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por
qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 04 julho de 2011 .

Assinatura :

E-mail: jucelyaparecida@hotmail.com

BANCA EXAMINADORA

Prof. Tit. Horácio Faig Leite (Orientador)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Profa.Dra. Vanessa Ávila Sarmiento Silveira

Faculdade de Pindamonhangaba – FAPI

Prof.Adj. Luiz Eduardo Blumer Rosa

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

São José dos Campos, 14 de Junho de 2011.

DEDICATÓRIA

À minha família, em especial à minha mãe MARIA ANTÔNIA RIBEIRO e aos meus irmãos JUAREZ RIBEIRO DA ROSA, LUCIANA DE FATIMA MELLO e LUCI APARECIDA OLIMPIO pelo carinho e apoio.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Meu agradecimento especial ao Professor Titular HORÁCIO FAIG LEITE,
pela orientação desta dissertação e pelos ensinamentos de grande
importância para a minha formação.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. JOSÉ ROBERTO RODRIGUES e do vice-diretor Prof. CARLOS AUGUSTO PAVANELLI.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. CRISTIANE YUMI KOGA ITO.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

À Profa. Adj. JANETE DIAS ALMEIDA, pela dedicação, pela amizade e pela paciência de me transmitir todos os seus conhecimentos.

À CAPES pela concessão de bolsa.

Ao prof. IVAN BALDUCCI, pela colaboração na análise estatística.

A Profa. Dra. RAQUEL GUEDES FERNANDES da Faculdade de Pindamonhangaba, pela ajuda na elaboração deste trabalho.

Ao funcionário PAULO ROGÉRIO MARTINS, da disciplina de anatomia, pela disponibilidade em ajudar sempre que preciso.

À funcionária do laboratório de apoio à pesquisa MARIA SALETE FARIA, pela ajuda na confecção das lâminas histológicas.

Aos funcionários do biotério ANTÔNIO DOMINGOS SÁVIO BARBOSA MAIA VASCONCELOS e MARCO ANTÔNIO CORREA ALFREDO, pela colaboração no tratamento dos animais.

Aos meus amigos de pós-graduação DANIEL DE OLIVEIRA LEITE, ERIKA CRISTINA SBRISSE PEREIRA, ARETHA GRAZIELA VILELA DE SOUSA, MONICA GHISLAINE OLIVEIRA ALVES e MIRIAM YUMI MATSUI, pelo auxílio nas etapas experimentais deste trabalho, pelo apoio e companheirismo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 Reparo ósseo.....	13
2.2 Bisfosfonato.....	14
3 PROPOSIÇÃO.....	31
4 MATERIAL E MÉTODO.....	32
4.1 Animais	32
4.2 Divisão dos grupos.....	32
4.3 Cálculo dos materiais.....	34
4.4 Procedimentos cirúrgicos.....	35
4.5 Eutanásia.....	37
4.6 Análise dos resultados.....	37
4.6.1 Análise histológica.....	38
4.6.2 Análise histomorfométrica.....	38
4.6.3 Análise estatística.....	39
5 RESULTADO.....	40

5.1 Análise histológica.....	40
5.1.1 Análise histológica - sete dias.....	41
5.1.2 Análise histológica - 21 dias.....	45
5.2 Análise histomorfométrica.....	50
5.3 Análise estatística.....	53
6 DISCUSSÃO.....	58
7 CONCLUSÃO.....	64
8 REFERÊNCIAS.....	65
ANEXO.....	75

Rosa J.A. Estudo da reparação óssea em fêmures de ratas sob a ação local do residronato de sódio [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

RESUMO

Esta pesquisa avaliou o efeito do uso local do residronato de sódio, em diferentes concentrações molares, no processo de reparação de defeitos ósseos em fêmures de ratas. Foi confeccionado no fêmur de 60 ratas um defeito ósseo medindo 2,5 mm de diâmetro. Estes animais foram divididos em grupos: controle (C), amido (Am), residronato 0,25 mol (Res 0,25), residronato 0,5 mol (Res 0,50), residronato 0,75 mol (Res 0,75) e residronato 1 mol (Res 1), de acordo com o material de preenchimento utilizado. Nos animais do grupo controle o defeito ficou preenchido apenas pelo coágulo. Os animais foram eutanasiados aos sete e 21 dias, e o fêmur foi removido, fixado e descalcificado, para a confecção de lâminas histológicas. Foram realizadas análises histológica e histomorfométrica, e os dados obtidos foram submetidos à análise estatística ANOVA. Histologicamente, as principais diferenças ocorreram após 21 dias. Os grupos C e Am apresentaram fechamento em extensão do defeito ósseo em todos os espécimes e a maioria dos animais dos grupos tratados com residronato em diferentes concentrações molares não exibiu neoformação óssea na região central do defeito, permanecendo este preenchido por tecido conjuntivo. Nos períodos de sete e 21 dias não houve diferença estatística significativa entre os grupos C e Am em relação a neoformação óssea. Estatisticamente, não houve diferença entre os grupos Res 0,25; Res 0,50; Res 0,75 e Res 1 no período de sete dias. Já no período de 21 dias o grupo Res 0,25 apresentou a maior média, mas não diferiu estatisticamente do grupo Res 0,75. Concluiu-se que o residronato de sódio em todas as concentrações molares, prejudicou a reparação óssea nesse modelo experimental. No entanto, foi observada uma neoformação óssea extra-cortical subperiosteal nos grupos que receberam residronato.

PALAVRAS-CHAVE: Regeneração óssea; osso; bifosfonatos; residronato.

Rosa J.A. Bone repair in rats femurs under local action of the sodium residronate [dissertation]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

ABSTRACT

This work evaluated the action of sodium residronate, in different molar concentrations, in the repair of bone defects in femurs of rats. A bone defect measuring 2,5 mm in diameter was made in the femur of 60 rats. These animals were divided in groups: control (C), starch (Am), residronate 0,25 mol (Res 0,25), residronate 0,50 mol (Res 0,50), residronate 0,75 mol (Res 0,75), residronate 1 mol (Res 1), in accordance with the material of fill used. In the animals of the control group, the defect was just filled by the clot originating from the defect. The animals were euthanized at seven and 21 days, when the femur was removed, fixed and decalcified, to make histologicals laminae. Histological and histomorphometric analyses were performed and the results obtained were submitted to statistical analysis ANOVA. Histologically, the principal differences occurred after 21 days. The groups C and Am, showed an extension closure of bone defect in every specimen and most animals in groups treated with residronate in different molar concentrations did not show bone neoformation in the central region of the bone defects, which remained filled with connective tissue. After seven and 21 days, there was no significant statistical difference among groups C and Am in relation to bone neoformation. Statistically, there were no differences among the groups Res 0,25; Res 0,50; Res 0,75 e Res 1 in the period of seven days. In the period of 21 days, the group Res 0,25 had the highest average, but did not differ statistically from the Res 0,75. It was concluded that the sodium residronate in all the molar concentrations, harmed the bone repair in this experimental model. However, there was an extracortical subperiosteal bone neoformation in groups receiving residronate.

Keywords: Bisphosphonates; residronate; bone regeneration; bone.

1 INTRODUÇÃO

O interesse pelo processo de reparação óssea é crescente, nas diversas áreas médicas e odontológicas. Várias pesquisas são realizadas com o intuito de descobrir materiais ou fármacos que acelerem este processo e que induzam a formação de tecido ósseo, principalmente em determinadas enfermidades onde este processo é prejudicado (Oliveira et al., 2004; Jaime et al., 2005; Pereira Alves et al., 2009; Plotkin et al., 2010).

Os bisfosfonatos são fármacos amplamente utilizados para tratamentos de doenças que apresentam alterações no metabolismo ósseo. Eles têm a característica de inibir a reabsorção óssea através da inativação da atividade osteoclástica e indução dos osteoclastos à apoptose (Kwak et al., 2009). Além dessa conhecida propriedade antirreabsortiva dos bisfosfonatos estudos tem demonstrado que eles aumentam a proliferação e diferenciação de osteoblastos e regulam a expressão de genes envolvidos no metabolismo ósseo, e que este fato pode estar relacionado a um efeito anabólico neste tecido (Zhou et al., 2011; Wang, Stern, 2011).

O residronato é considerado um dos mais potentes entre os bisfosfonatos orais disponíveis no mercado (Szejnfeld, 2000; Russell, 2007). Estudos com residronato demonstraram potente atividade anti-osteoclástica, com aumento da massa óssea de modo dose-dependente (Iwata et al., 2006). O residronato não só diminui a perda óssea como também aumenta a taxa de mineralização óssea, entretanto, interfere na taxa de remodelação do calo ósseo atrasando a substituição do osso primário por osso lamelar (Senra, 2009).

Os bisfosfonatos vêm sendo empregado na odontologia no intuito de inibir a reabsorção óssea após cirurgias com execução de retalho mucoperiosteal, como auxiliar no tratamento das periodontites e ainda associados aos materiais de implantes dentários. Esses casos demonstram que a administração local também é eficaz (Meraw et al., 1999; Yaffe et al., 2000; Shibata et al., 2004; Komatsu et al., 2008).

Alguns estudos realizados no sentido de utilizar localmente o alendronato sódico, em defeitos ósseos em fêmures de ratos, concluíram que o alendronato sódico interfere negativamente na reparação óssea (Fernandes 2005; Canettieri et al., 2009). Entretanto, em um estudo utilizando residronato de sódio na consolidação de fraturas concluiu-se que o residronato exerceu influência positiva no processo de consolidação de fraturas em ratos, aumentou a densidade mineral óssea e ocasionou a formação de tecido ósseo maduro e de melhor qualidade (Oliveira et al., 2004).

Devido ao fato de existirem na literatura inúmeros trabalhos que descrevem que os efeitos dos bisfosfonatos no tecido ósseo são dose dependente (Reinholz et al., 2000; Plotkin et al., 2006; Corrado et al., 2010; Wang, Stern, 2011), e variam conforme as diferenças na estrutura molecular entre os membros desta classe de drogas (Russell, 2007), acreditamos ser importante continuarmos a estudar a ação local dos bisfosfonatos, em especial do residronato de sódio, em diferentes concentrações molares, no reparo de defeitos ósseos em ratas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Reparo ósseo

O tecido ósseo apresenta uma excelente capacidade de reparação, ele é capaz de se regenerar completamente sem que seja observada qualquer cicatriz (Buser, 1994; Schenk, 1996).

O processo de reparo ósseo pode ser morfológicamente dividido em três fases: exsudativa, caracterizada pela formação de coágulo de fibrina; proliferativa marcada pela proliferação fibroblástica e capilar; e reparadora, com síntese de colágeno e mineralização da matriz extracelular (Curvêllo et al., 2008). Em inúmeras situações, o tecido ósseo é capaz de se restabelecer. Entretanto, falhas de vascularização e instabilidade mecânica podem influenciar na extensão, na velocidade e na qualidade do reparo, dificultando ou até mesmo impedindo o reparo ósseo adequado (Pinheiro, Gerbi, 2006).

Após todo o processo de formação e remodelação óssea, os tecidos assumirão o aspecto morfológico que tinham antes da lesão, ou seja, de tecido ósseo esponjoso ou cortical compacto. O processo de remodelação óssea é caracterizado por remover o tecido ósseo danificado e substituí-lo por osso novo mantendo a integridade tecidual (Trownbridge, Emling, 1996; Junqueira, Carneiro, 2004).

A remodelação óssea é um processo cíclico que envolve reabsorção e formação do osso assim como sua mineralização (Rang e t al., 2004). As células responsáveis por este processo são os osteoclastos e os osteoblastos, respectivamente. Agindo em conjunto, formam a unidade multicelular básica (BMU). Os osteoblastos são responsáveis pela síntese

de colágeno e de outras proteínas constituintes da matriz óssea e também concentram fosfato e cálcio, participando da mineralização da matriz. Além disso, eles controlam a diferenciação dos osteoclastos durante o contato intercelular (Boyle et al., 2003; Rang et al., 2004; Junqueira, Carneiro, 2004). Para que uma mineralização ocorra sem distúrbio, existem requisitos básicos, como uma concentração adequada de íons cálcio e fosfato, presença de matriz a ser calcificada, agentes de nucleação e controle de agentes reguladores (promotores e inibidores). Além destes, a formação óssea depende de dois pré-requisitos indispensáveis: suporte sanguíneo amplo e suporte mecânico (Buser, 1994)

O reparo de defeitos ósseos é um bom modelo para o estudo da regeneração óssea. Ao contrário das fraturas, os defeitos são menos propensos a fatores mecânicos e obstruções do suprimento sanguíneo (Schenk, 1996). Portanto, diversos são os estudos realizados simulando traumas ósseos, para observar a reparação de defeitos ósseos em animais (Fernandes, 2005; Canettieri et al., 2009; Senra, 2009).

2.2 Bisfosfonatos

Os bisfosfonatos são estruturalmente análogos químicos ao pirofosfato presente no organismo, um inibidor natural da reabsorção óssea. No entanto, este não pode ser utilizado como agente terapêutico, pois sofre uma rápida hidrólise enzimática. O pirofosfato é constituído por um átomo de oxigênio que está ligado a dois grupos de fosfato (P-O-P). Nos bisfosfonatos este átomo de oxigênio é substituído por um átomo de carbono (P-C-P). Essa modificação faz com que os bisfosfonatos sejam mais resistentes a degradação enzimática (Bikle, 1998; Russel, Rogers, 1999). Conforme as mudanças em suas cadeias laterais são formados

vários tipos de bisfosfonatos, cada um com propriedades farmacológicas, atividade na reabsorção óssea e potência diferentes, determinadas pela cadeia lateral (Compston, 1994; Szejnfeld, 2000). Existem três gerações de bisfosfonatos. A primeira é composta pelos não nitrogenados, que inclui os análogos do trifosfato de adenosina (ATP) etidronato, clodronato e o tiludronato (Lehenkari et al., 2002; Reszka, 2004; Carter et al., 2005). A segunda e a terceira gerações são compostas pelos nitrogenados. Os da segunda geração, alendronato, pamidronato e ibandronato (Tenenbaum et al., 2002; Fernández et al., 2006). Os bisfosfonatos da segunda geração são de 10 a 1000 vezes mais potentes que os da primeira (Lin, 1996). Os da terceira geração contêm uma cadeia cíclica, sendo seus representantes o residronato e o zoledronato (Rogers et al., 2000; Tenenbaum et al., 2002). O aumento da atividade antirreabsortiva está relacionado com o comprimento da cadeia de carbono, a presença de grupos hidroxilas, o grupo amino e a conformação espacial da molécula (Neves et al., 2003). Em ordem decrescente de potência e atividade antirreabsortiva, os principais bisfosfonatos nitrogenados são: ácido zoledrônico, residronato, ibandronato, icandronato, alendronato, e pamidronato (Russell, 2007).

Os bisfosfonatos apresentam, basicamente, duas categorias de estrutura química, que são os bisfosfonatos nitrogenados e os não-nitrogenados e atuam por diferentes mecanismos de ação. Os bisfosfonatos não-nitrogenados são mais fracos e mais parecidos com o pirofosfato, como o clodronato e o etidronato, podem ser metabolizados em análogos citotóxicos do não-hidrolizáveis que serão então incorporados pelos osteoclastos levando-os a apoptose. Em contraste, bisfosfonatos que contêm nitrogênio na fórmula, que são mais potentes, como o alendronato e o residronato, não são metabolizados e atuam na via do mevalonato (Leu et al., 2006).

Os bisfosfonatos nitrogenados através da via do mevalonato inibem a farnesil difosfato sintetase, uma enzima requerida

para a produção da geranilgeranil difosfato. Esta liga proteínas a membrana celular por um processo chamado de isoprenilação de proteínas. A depleção desta enzima limita a prenilação de pequenas proteínas regulatórias que controlam a forma celular e a formação da borda em escova dos osteoclastos (Stepan et al., 2003).

A estrutura química dos bisfosfonatos determina além da fixação ao osso e de sua potência, efeitos intracelulares (Lehenkari et al., 2002). Os dois efeitos biológicos fundamentais são: inibição da calcificação, normal e ectópica, quando administrados em altas doses, e inibição da reabsorção óssea (Fleisch, 1998). Outros efeitos como inibição da angiogênese (Santini et al., 2002; Zervas et al., 2006), da proliferação e do reparo tecidual de células epiteliais orais *in vitro* (Landesberg et al., 2008), e fibrose dos espaços medulares (Hansen et al., 2006; Bedogni et al., 2008) foram relatados.

Os bisfosfonatos inibem a reabsorção óssea por uma ação direta sobre os osteoclastos e por um efeito indireto mediado pelos osteoblastos que liberam inibidores de atividade e do recrutamento osteoclástico (Warner, 2000; Kulak, Bilezikian, 2000; Kwak et al., 2009). Além dessa conhecida propriedade antirreabsortiva dos bisfosfonatos estudos tem demonstrado que eles também atuam na atividade osteoblástica (Giuliane et al., 1998; Reinholz et al., 2000; Knoch et al., 2005; Corrado et al., 2010) e regulam a expressão de alguns genes relacionados com a formação óssea (Valenti et al., 2010; Zhou et al., 2011; Wang, Stern, 2011).

Giuliani et al. (1998) estudaram os efeitos do etidronato e do alendronato sobre a formação de precursores de células osteoblásticas, medindo o número de unidades formadoras de colônia de fibroblastos (UFC-F) e de unidades formadoras de colônia por osteoblastos (UFC-OB), em camundongos e em cultura de células de medula óssea humana. Em cultura de medula óssea de murinos, o etidronato (10^{-5} a 10^{-9} mol/L) estimulou significativamente a formação de

UFC-F com um efeito máximo em 10^{-5} mol/L, enquanto que o alendronato teve um efeito bifásico, sendo estimulante em concentrações abaixo de 10^{-7} mol/L e inibitória em altas doses. A formação de UFC-OB também foi inibida por ambos os bifosfonatos nas concentrações mais elevadas, mas foi significativamente estimulada em baixas concentrações. Em culturas de medula óssea humana, o alendronato (10^{-8} a 10^{-12} mol/L) aumentou a formação de UFC-F com um efeito máximo em 10^{-10} mol/L. Os autores também realizaram estudos *in vivo* para avaliar os efeitos em curto prazo desses bisfosfonatos na formação de precursores de osteoblastos em cultura de medula óssea de ratas jovens e senis. Os animais jovens foram tratados semanalmente com injeções subcutâneas de etidronato (0,3 mg/Kg, 3 mg/Kg e 30 mg/Kg) ou alendronato (0,3 µg/Kg, 3 µg/Kg e 30 µg/Kg). Os animais senis foram tratados com as doses mais baixas de ambas as drogas. Após um mês de tratamento, os animais jovens e senis foram sacrificados e, de cada animal foram obtidas células da medula óssea. Posteriormente, estas células foram utilizadas para a etapa do estudo *in vitro*, no qual foram observadas as unidades formadoras de colônias. Os resultados obtidos demonstraram que o etidronato (0,3 e 3 mg/kg) e o alendronato (0,3 e 3 mg/kg) aumentaram significativamente o número de colônias de UFC-F na medula óssea de animais jovens e senis, enquanto que a maior dose de ambas as drogas não tiveram efeito nos ratos jovens. Os autores finalizaram seus estudos sugerindo que os bisfosfonatos podem ter *in vivo* uma influência potencialmente relevante em células da linhagem osteoblástica, distinta da sua ação inibitória sobre os osteoclastos.

Reinholz et al. (2000) estudaram a ação direta de vários bisfosfonatos na proliferação celular, expressão gênica e formação óssea por meio de culturas de osteoblastos provenientes de fetos humanos. Em culturas tratadas com pamidronato, ocorreu um aumento da proteína celular total, da atividade de fosfatase alcalina, bem como a secreção de colágeno tipo I em osteoblastos. Além disso, também ocorreu um

aumento da taxa de formação óssea nesta cultura de osteoblastos. As ações de dois outros bisfosfonatos, a fraca ação do etidronato e o potente zoledronato também foram comparados com a ação do pamidronato sobre a proliferação dos osteoblastos humanos e sobre a taxa de formação óssea. O pamidronato e o zoledronato diminuíram a proliferação celular com igual potência, ao passo que o etidronato diminuiu esta proliferação somente em concentrações muito altas. Quanto à formação óssea, o pamidronato e o zoledronato aumentaram a formação óssea, porém nenhum aumento foi observado pela ação do etidronato. Os autores finalizaram seu trabalho afirmando que estes resultados sugerem fortemente que o tratamento com pamidronato ou zoledronato aumenta a diferenciação e as atividades da formação óssea dos osteoblastos.

Knoch et al. (2005) estudaram os efeitos dos bisfosfonatos: alendronato, residronato e zoledronato em cultura de células de medula óssea humana, obtidos de pacientes com doença articular degenerativa submetidos à artroplastia total do quadril. Os autores evidenciaram a proliferação celular e diferenciação osteogênica determinada por, além da contagem de células, aumento dos níveis de fosfatase alcalina.

Valenti et al. (2010) avaliaram os efeitos do residronato de sódio na modulação da formação óssea em ratas com osteoporose induzidas pelos glicocorticóides, por meio de histomorfometria, imunoistoquímica e análises de expressão gênica. Utilizaram -se 40 ratas que foram divididas em 4 grupos: 1) grupo controle - veículos de metilprednisolona (vGC) + veículo de residronato (vRes); 2) grupo Res - 5 mg/kg Res + vGC; 3) grupo GC - metilprednisolona (GC) 7 mg/kg + vRes; 4) grupo GC + Res - 7 mg/kg GC + 5 mg/kg Res. Os autores concluíram que o residronato reduziu a apoptose de osteócitos induzida pelos glicocorticóides e aumentou a expressão gênica da enzima cicloxigenase 2 (COX-2) em relação ao grupo controle.

Zhou et al. (2011) estudaram o efeito do ibandronato, um bisfosfonato contendo nitrogênio, sobre a proliferação e a diferenciação de células indiferenciadas presentes no ligamento periodontal com características de osteoblastos (PDLSCs) em cultura de células, e analisaram a expressão de genes envolvidos na diferenciação osteoblástica. Neste estudo o ibandronato promoveu a proliferação de PDLSCs e aumentou a expressão de fosfatase alcalina, colágeno tipo 1, osteoprotegerina e osteocalcina. Em PDLSCs, o ibandronato regulou a expressão de diversos genes relacionados com a formação óssea.

Wang e Stern (2011) realizaram um estudo para comparar os efeitos de concentrações alta e baixa de residronato na expressão de genes em células osteoblásticas (linhagem UMR 106). Os autores observaram que a baixa concentração de residronato transitoriamente regulou vários genes associados com a diferenciação celular e em altas concentrações isto não foi observado.

Os bisfosfonatos são drogas pouco absorvidas pelo trato digestivo. No intestino parte dos bisfosfonatos são quelados pelo cálcio. Os bisfosfonatos desaparecem rapidamente da circulação sanguínea, sendo incorporados ao tecido ósseo por meio de forte ligação com os cristais de hidroxiapatita e parte da droga é eliminada na urina (Compston, 1994; Szejnfeld, 2000; Rodan, Reszka, 2003).

Os compostos dos bifosfonatos são hidrofílicos e altamente solúveis em água, conjugando a natureza ácida ao pH fisiológico, eles dificilmente ultrapassam membranas celulares de tecidos moles. Essa propriedade físico-química também reduz a capacidade intrínseca da substância ao metabolismo, promovendo excreção urinária e biliar da molécula praticamente não alterada (Hirabayashi, Fujisaki, 2003).

O tempo de permanência dos bisfosfonatos no organismo é longo, podendo durar dez anos ou mais, dependendo da velocidade de remodelação do tecido ósseo (Szejnfeld, 2000; Stepensky et al., 2003). O bisfosfonato incorporado à matriz óssea é farmacologicamente inativo até

ser liberado em um novo foco de reabsorção através da acidificação, enquanto que o resto do medicamento ligado ao osso em outros locais permanece praticamente quiescente (Stepensky et al., 2003).

Estes medicamentos são atualmente empregados para o tratamento de varias enfermidades do metabolismo ósseo, tais como a osteoporose pós-menopausa e induzida por corticoterapia (Bagan et al., 2005). Também são empregados no manejo de complicações relacionadas a neoplasias, como hipercalcemia maligna, lesões osteolíticas do mieloma múltiplo e metástases ósseas associadas ao câncer de mama, próstata, pulmão e a outros tumores. Os bisfosfonatos também podem ser utilizados no tratamento da doença de Paget e na osteogênese imperfeita (Landesberg et al., 2008).

Watts et al. (2003) estudaram o residronato usando pacientes em pós-menopausa com alto risco de fraturas vertebrais. Um total de 1226 pacientes de vários países e 2458 nos EUA participaram do estudo, utilizando um placebo ou residronato 2,5 ou 5 mg/dia. Os autores demonstraram que, após um ano de uso do residronato, houve redução de fraturas vertebrais em 90% quando comparado a mulheres que receberam placebo.

Oliveira et al. (2004) avaliaram a influência do residronato sódico, no processo de consolidação de fraturas em ratos machos adultos nutridos e subnutridos, nos quais foram provocadas fraturas nas tíbias direitas. Os autores concluíram através de análise radiográficas, densitométrica e histológica do calo ósseo que o residronato contribuiu para a formação de tecido ósseo maduro e de melhor qualidade. Na avaliação laboratorial dos níveis de cálcio, observaram diferença significativa nos níveis séricos do cálcio nos grupos que receberam o residronato tanto de dieta aprotéica como o de dieta protéica, confirmando o efeito hipocalcemiante dos bisfosfonatos.

Piai et al. (2005) avaliaram os efeitos do residronato na reparação óssea de ratos machos e fêmeas com osteopenia, através de

análises histológica e histomorfométrica. Utilizaram-se 30 ratos machos e 30 fêmeas castrados e após um mês deste procedimento, confeccionaram um defeito ósseo de 3 mm de diâmetro nas tíbias direitas dos animais. Estes foram divididos em quatro grupos: I (machos controle); II (machos tratados); III (fêmeas controle); IV (fêmeas tratadas). Administrou-se nos grupos II e IV, após execução do defeito, 0,1 mg/Kg/dia de residronato na água de beber, durante cinco dias e nos grupos I e III, somente água. Os animais foram sacrificados após sete, 14 e 28 dias a realização do defeito. Os autores concluíram que o residronato não exerceu efeito estimulador sobre a reparação óssea.

Volpon et al. (2008) analisaram o efeito do alendronato na prevenção da osteopenia secundária à imobilização gessada, em ratas, por meio da histomorfometria. Foram utilizados vinte animais divididos em quatro grupos: 1) imobilizado; 2) não imobilizado + alendronato; 3) imobilizado + alendronato; e 4) controle. A imobilização foi feita com gesso pelvipodálico aplicado até o membro posterior direito e o alendronato foi administrado em doses semanais. O período de observação foi de 28 dias. Na análise histomorfométrica da metáfise proximal da tíbia, foi avaliado o número de trabéculas, volume ósseo, espessura trabecular e separação trabecular. Os autores concluíram que a imobilização empregada efetivamente levou à osteopenia, verificada pela diminuição de todos os principais parâmetros histomorfométricos estudados. Estas alterações foram prevenidas pela administração concomitante de alendronato de sódio, exceto com relação à espessura trabecular. O alendronato de sódio foi capaz de aumentar os parâmetros morfométricos, mesmo em animais não imobilizados.

Pereira Alves et al. (2009) avaliaram, através de análises biomecânicas e histomorfométrica, a ação do ácido zoledrônico, um bisfosfonato nitrogenado, em tíbias de ratas osteoporóticas. Utilizaram quarenta ratas sendo vinte ovariectomizadas e vinte falso operadas (*sham*). Os animais foram divididos em quatro subgrupos, de acordo com

a administração de 0,1 mg/kg de ácido zoledrônico (AZ) ou água destilada (AD): OAZ (n=10), OAD (n=10), PAZ (n=10) e PAD (n=10). Após 12 meses, os animais foram eutanasiados e suas tíbias analisadas. No estudo clínico foi considerado o peso dos animais; no estudo biomecânico foram realizados ensaios compressivos e na análise histomorfométrica foi determinada a área trabecular óssea. Os resultados mostraram aumento, não significativo, tanto da resistência óssea diafisária tibial, como da área trabecular óssea.

Ferreira Júnior et al. (2008) avaliaram os efeitos do alendronato de sódio, residronato sódico, atorvastatina cálcica e lovastatina na reparação de fraturas em ratas com osteoporose induzidas pela dexametasona. Os efeitos desses fármacos foram analisados pelos marcadores bioquímicos cálcio, fósforo, albumina, proteínas totais, fosfatase alcalina e exame histomorfométrico de densidade trabecular óssea. Além disso, os autores realizaram morfometria através das medidas de comprimento, espessura, diâmetro do calo ósseo e densidade das tíbias dos animais. Os autores concluíram que o reparo ósseo foi semelhante ao do grupo controle, o que demonstra que os fármacos usados são eficazes em animais osteoporóticos submetidos à fratura, ressaltando que os melhores efeitos foram obtidos com o alendronato.

Balooch et al. (2007) realizaram um estudo para avaliar se o tratamento concomitante com glicocorticóides (Gcs) e residronato evitaria a redução da resistência óssea induzida por Gcs. Para isto os autores utilizaram ratos tratados com Gcs, Gcs + residronato ou placebo. Além disso, foram realizadas biópsias de crista ilíaca obtidas de pacientes atendidos em um estudo clínico que foram tratados com Gcs, Gcs + residronato ou placebo por um ano. Os autores analisaram a arquitetura óssea, densidade e as suas propriedades físicas, através de tomografias de raios-X síncroton, mapeamento do modulo de elasticidade e microscopia eletrônica de transmissão. Concluíram que o residronato

impediu as mudanças locais no tecido ósseo induzidas por Gcs, e que isto pode vir a melhorar a resistência óssea.

Mahl et al. (2009) avaliaram a densidade radiográfica e a proporção trabecular do fêmur de ratas submetidas à administração de glicocorticóide, seguida ou não de bisfosfonato. Foram utilizadas 36 ratas Wistar, alocadas a três grupos: (1) controle, (2) glicocorticóide e (3) glicocorticóide + bisfosfonato. O grupo 1 recebeu injeções subcutâneas (2 mL/kg) de solução salina, os grupos 2 e 3 receberam acetato de metilprednisolona (1 mg/kg), sendo que o grupo 3 foi tratado adicionalmente com residronato (3 mg/kg). Os animais foram eutanasiados e cada fêmur esquerdo foi dissecado, radiografado e submetido a processamento histológico. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente. Os autores concluíram através dos resultados obtidos que a administração de residronato recupera a proporção de trabéculas ósseas diminuídas pela ação do corticóide e que estas alterações são radiograficamente detectáveis.

Iwamoto et al. (2009) avaliaram o efeito da vitamina K2 (menaquinona) e do residronato no osso trabecular em ratos tratados com glicocorticóide (Gc). Os animais foram divididos em 5 grupos: controle pareado por idade; Gc; Gc + K2; Gc + residronato; Gc + residronato + K2. Após oito semanas, os animais foram sacrificados e foi feita análise histomorfométrica no osso na metáfise proximal da tíbia. Os resultados obtidos foram que a administração de Gc diminuiu a massa óssea trabecular em comparação com controles pareados por idade. A vitamina K2 atenuou a perda óssea induzida pelo Gc e o residronato impediu a perda óssea. Os autores concluíram que a vitamina K2 e o residronato mostraram efeito diferencial em osso trabecular em ratos tratados com Gc.

Iwamoto et al. (2010) fizeram uma revisão de literatura para discutir os efeitos do residronato na osteoartrose do joelho. Em conclusão a revisão de literatura sugeriu que altas doses de residronato

(15 mg/dia) reduzem fortemente o marcador de degradação de cartilagem o que pode contribuir para a atenuação da progressão radiológica da osteartrose, por meio da preservação da integridade estrutural do osso subcondral.

Chevalier et al. (2010) realizaram um estudo para avaliar os efeitos biomecânicos da teriparatide, medicamento derivado do hormônio da paratireóide usado no tratamento da osteoporose, em mulheres com osteoporose tratadas previamente com alendronato e residronato por dois anos ou mais. Os autores criaram modelos de elemento finito da primeira vértebra lombar (L1) a partir de tomografia computadorizada quantitativa de 171 pacientes. Estes modelos foram submetidos à compressão uniaxial, a análise foi realizada antes e após doze meses de terapia com teriparatide. Os resultados deste estudo demonstraram que doze meses de tratamento com teriparatide após tratamento prévio com residronato ou alendronato aumentou a rigidez vertebral, a carga de ruptura e a densidade mineral óssea. No entanto, os efeitos foram mais pronunciados em pacientes previamente tratados com residronato.

Os bisfosfonatos reduzem a remodelação óssea, processo responsável por manter a integridade deste tecido, e alguns autores afirmam que isto pode impedir a reparação de microlesões que, acumuladas levariam a diminuição das propriedades mecânicas do osso (Mashiba et al., 2000; Mashiba et al., 2001; Turner, 2002).

Allen et al. (2006) estudaram os efeitos causados pelo tratamento com residronato ou alendronato, no tecido ósseo em beagles fêmeas, com doses equivalentes às utilizadas para o tratamento da osteoporose. Os autores verificaram que um ano de tratamento com bisfosfonatos, em doses clínicas, permite acúmulo significativo de microlesões em vértebras de cães. Entretanto, isso foi compensado pelo aumento do volume e mineralização óssea de tal forma que não houve comprometimento significativo das propriedades mecânicas.

Senra (2009) avaliou o efeito do residronato (10,5 mg/kg/semana) na qualidade óssea do reparo ósseo em ratas com deficiência estrogênica. Para isso, 84 ratas foram submetidas à ovariectomia e 42 ratas à cirurgia *sham*. Após 35 dias, lesões de 2,5 mm foram realizadas nos fêmures quando, então, se iniciou a medicação. Os animais ovariectomizados foram divididos em dois grupos, um recebendo residronato e o outro recebendo água filtrada como placebo. Os animais foram sacrificados com 18, 45 e noventa dias de reparo. Os resultados indicaram que o tratamento com residronato aumentou os valores de microdureza e de módulo de elasticidade; não afetou os valores da concentração de cálcio (Ca) e de fósforo (P) e da relação Ca/P do calo ósseo, porém o tratamento com residronato atrasou a remodelação do calo ósseo.

Os bisfosfonatos são medicamentos bem tolerados tanto por via oral como intravenosa, mas podem apresentar alguns efeitos adversos. Por via oral, os efeitos adversos mais freqüentes são: cefaléia, dispepsia, diarreia, constipação intestinal e esofagite corrosiva. Os efeitos adversos mais freqüentes da administração intravenosa são elevação da temperatura e síndrome gripal, facilmente contornadas com analgésicos e antipiréticos. Podem ocorrer hipocalcemia e hipofosfatemia transitórias, geralmente sem repercussão clínica (González, Nieto, 2005).

Um estudo comparativo macroscópico e histológico dos aminobifosfonatos (pamidronato, alendronato e residronato) mostrou que o residronato exibiu efeitos gástricos mais favoráveis e seguros que os aminobifosfonatos primários (Blank et al., 1997). Kanatsu et al. (2004) demonstraram que, embora o residronato possua efeitos irritativos e de prejuízo à cicatrização de lesões estomacais pré-existentes, seus efeitos são muito menos pronunciados que os do alendronato.

Recentemente, foi identificada uma nova complicação oral associada ao uso dos bisfosfonatos, denominada osteonecrose dos maxilares. De acordo com a Associação Americana de Cirurgiões Orais e

Maxilofaciais, a osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos se caracteriza clinicamente por exposições ósseas na região maxilofacial persistentes por mais de oito semanas, com história médica de uso de bisfosfonatos e sem história de radioterapia nos maxilares.

A grande maioria dos casos de osteonecrose dos maxilares descritos na literatura são de pacientes portadores de mieloma múltiplo ou de metástases ósseas associadas ao câncer de mama, próstata ou pulmão que foram tratados com bisfosfonato intravenoso; porém, essa condição, vem sendo identificada em pacientes com osteoporose tratados apenas com formulações orais de bisfosfonatos (Ruggiero et al., 2004; Marx et al., 2007; Yarom et al., 2007). A maioria dos casos de osteonecrose associada à bisfosfonatos esta associada também a procedimentos cirúrgicos (Brooks et al., 2007).

A patogênese da osteonecrose dos maxilares não está completamente esclarecida, mas parece estar relacionada com as alterações vasculares e da estrutura óssea causadas pelos bisfosfonatos. Acredita-se que a osteonecrose dos maxilares resulte de uma interligação entre metabolismo ósseo alterado pelos bisfosfonatos, trauma local, aumento da necessidade de reparo ósseo, infecção e hipovascularização (Migliorati, 2005; Ruggiero et al., 2006).

Os bisfosfonatos são utilizados por diferentes vias de administração, sendo a via oral a mais comum delas. No entanto, alguns trabalhos que utilizaram bisfosfonatos localmente demonstraram que essa via também é eficaz no controle da reabsorção óssea (Yafee et al., 1997; Meraw et al., 1999; Jaime et al., 2005; Komatsu et al., 2008).

Yafee et al. (1997) avaliaram 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. Os autores observaram que o alendronato reduziu a reabsorção óssea

ativada pela cirurgia de retalho mucoperiosteal e finalizaram seu trabalho sugerindo que a aplicação local de alendronato pode ser utilizada como adjuvante na terapia para reduzir a reabsorção óssea após a cirurgia.

Levin et al. (2001) estudaram em cães os efeitos da imersão em solução de alendronato antes do reimplante de dentes avulsionados e mantidos a seco por períodos de 40 ou 60 minutos. Após 4 meses deste procedimento os animais foram sacrificados e as raízes preparadas para a análise histológica. As raízes que permaneceram imersas no alendronato antes do reimplante apresentaram resultados estatisticamente significativos quanto à presença de maiores superfícies reparadas sem evidências de reabsorção. Os autores concluíram que a imersão em alendronato resulta em menor perda de estrutura radicular por reabsorção em comparação com o grupo em que as raízes foram imersas em solução salina sem alendronato.

Komatsu et al. (2008) avaliaram os efeitos a longo prazo do alendronato administrado topicamente em dentes reimplantados de ratos. Os autores extraíram os primeiros molares de ratos e colocaram em solução salina com 1 mM de alendronato (grupo alendronato n=13) ou em solução salina (grupo salina n=8) por cinco minutos e depois reimplantaram. Os animais foram sacrificados 60 e 120 dias após o reimplante. As análises foram realizadas com tomografia microcomputadorizada. Foram analisadas a reabsorção óssea e radicular, anquilose e calcificação pulpar. No grupo alendronato as reabsorções óssea e radicular foram menores que as do grupo salina. No entanto, a anquilose e a calcificação pulpar ocorreram em ambos os grupos. No grupo alendronato ocorreu uma expansão óssea ao redor dos dentes reimplantados e os autores sugerem que o alendronato pode também estimular a formação óssea em torno dos dentes reimplantados de ratos.

Kajiwara et al. (2005) analisaram, *in vivo*, a quantidade de tecido ósseo neoformado ao redor de implantes de titânio puro, com cobertura de íons de cálcio e com modificação dessa cobertura utilizando

pamidronato, um bisfosfonato nitrogenado, por meio de marcadores fluorescentes administrados por via intravenosa durante o experimento. Os autores concluíram que implantes com bisfosfonatos nitrogenados imobilizados estimulam a formação de osso ao redor do implante, o que pode contribuir para o sucesso do tratamento com implantes.

Jaime et al. (2005) analisaram a influência do alendronato sódico tópico sobre o reparo de defeitos ósseos em calvária de ratas ovariectomizadas histomorfologicamente e morfometricamente. Os defeitos foram preenchidos com esponja de colágeno reabsorvível embebida em solução de alendronato sódico na concentração de 20 mg/mL ou em solução fisiológica (controle). Concluíram que a ovariectomia e/ou aplicação tópica de alendronato sódico não influenciaram o reparo ósseo de defeitos em calota de ratas.

Menezes et al. (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. Concluíram 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.

Adachi et al. (1994) examinaram o efeito tópico do residronato no movimento dentário em 126 ratos, considerando que este fármaco inibe a reabsorção óssea. Moveram os primeiros molares superiores para vestibular por meio de uma mola por 3 semanas com a força de 165 mN. Após a remoção da mola iniciaram a injeção de

residronato subperiostealmente, na area adjacente ao primeiro molar esquerdo na dosagem de 50 µl de solução de residronato em uma concentração de 0, 125, 250, ou 500 µmol/l a cada três dias durante as três semanas do experimento. A mola movendo ambos os primeiros molares produziu uma expansão e a aplicação tópica do residronato inibiu a recidiva. No primeiro molar direito injetaram solução salina 0,9% como controle. A administração tópica do residronato provocou uma significativa redução do movimento dentário induzido pela força aplicada. Em sua conclusão os autores sugerem que a aplicação tópica do residronato pode auxiliar na ancoragem dos dentes, durante o tratamento ortodôntico.

Alguns estudos vêm sendo realizados no sentido de se disponibilizar localmente moléculas de alendronato sódico, hidroxiapatita e sua associação em defeitos ósseos cirúrgicos em fêmures de ratos. Estes têm verificado que o fármaco utilizado interfere negativamente na reparação óssea. No entanto, foi observado uma neoformação óssea extra-cortical subperiosteal (Fernandes, 2005; Canettieri et al., 2009).

Fernandes et al. (2005) avaliou o efeito do uso local do alendronato sódico, da hidroxiapatita e da associação alendronato mais hidroxiapatita em diferentes concentrações molares, no processo de reparação de defeitos ósseos em fêmures de ratos. Foi confeccionado no fêmur de 168 ratos (84 machos e 84 fêmeas) um defeito ósseo medindo 2,5 mm de diâmetro. Estes animais foram divididos em grupos: controle, amido, alendronato 1 mol, alendronato 2 moles, hidroxiapatita 1 mol, hidroxiapatita 2 moles e alendronato mais hidroxiapatita, de acordo com o material de preenchimento utilizado. Nos animais do grupo controle o defeito ficou preenchido apenas pelo coágulo proveniente do defeito. Os animais foram sacrificados aos sete e 21 dias. Foram realizadas análises histológica e histomorfométrica, e os dados obtidos foram submetidos à análise estatística ANOVA. O autor Concluiu que a aplicação local do alendronato sódico interferiu negativamente na reparação óssea, que a hidroxiapatita e o alendronato mais a hidroxiapatita não interferiram na

reparação. Contudo, observou a presença de uma neoformação óssea subperiosteal extra-cortical em todos os animais dos grupos experimentais, tanto aos sete como aos 21 dias, onde o alendronato sódico foi usado, ou seja, nos grupos alendronato 1 mol e 2 moles, bem como no grupo alendronato mais hidroxiapatita.

Canettieri et al. (2009) avaliaram o efeito do uso local do alendronato sódico, da hidroxiapatita e da associação alendronato com hidroxiapatita na reparação de defeitos ósseos em fêmures de ratas ovariectomizadas. Foram utilizadas 98 ratas. Estas foram ovariectomizadas e, após trinta dias, os defeitos ósseos, medindo 2,5 mm de diâmetro, foram feitos nos fêmures esquerdos. Estes animais foram divididos em grupos: controle (C), amido (Am), alendronato 1 mol (A1), alendronato 2 moles (A2), hidroxiapatita 1 mol (HA1), hidroxiapatita 2 moles (HA2) e alendronato mais hidroxiapatita (A+HA), de acordo com o material de preenchimento utilizado nos defeitos, sendo que o grupo controle o defeito foi preenchido apenas pelo coágulo. Os animais foram sacrificados sete e 21 dias após a cirurgia. Foram realizadas análises histológica e histomorfométrica da área do defeito ósseo e os resultados submetidos à análise estatística. Concluíram que o alendronato sódico, isolado ou associado com a hidroxiapatita, prejudicou a reparação óssea neste modelo experimental. No entanto, evidenciaram nos grupos A1, A2 e A+HA, nos períodos de sete e 21 dias, a presença de neoformação óssea extra-cortical subperiosteal.

Devido ao crescente interesse em se desenvolver drogas ou materiais que estimulem a formação óssea e acelerem o processo de reparação, torna-se importante dar continuidade aos estudos anteriores.

3 PROPOSIÇÃO

Estudar a reparação óssea após a aplicação local do residronato de sódio, em diferentes concentrações molares, em defeitos ósseos criados em fêmures de ratas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

A realização desta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos - UNESP sob o protocolo de número 047/2009 - PA/CEP (ANEXO A) e executada de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal que são adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Neste estudo, foram utilizadas 60 ratas (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar) com aproximadamente três meses de idade e pesando em média trezentos gramas. Estes animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos - UNESP, onde permaneceram durante toda a etapa experimental em gaiolas coletivas, à temperatura ambiente, e alimentados com ração à vontade e água *ad libitum*.

4.2 Divisão dos grupos

Os 60 animais foram divididos em 6 grupos constituídos por 10 animais cada. Os grupos experimentais foram denominados por: grupo controle (C), grupo amido (Am), grupo residronato - 0,25 mol (Res 0,25), grupo residronato - 0,50 mol (Res 0,50), grupo residronato - 0,75 mol (Res 0,75), residronato – 1 mol (Res 1) (Quadro1).

Quadro 1 - Grupos experimentais

Grupo experimental	Nº de animais
Controle (C)	10
Amido (Am)	10
Residronato 0,25 mol (Res 0,25)	10
Residronato 0,5 mol (Res 0,50)	10
Residronato 0,75 mol (Res 0,75)	10
Residronato 1mol (Res 1)	10
Total	60

Todos os animais foram submetidos a uma cirurgia para a confecção de um defeito ósseo, sendo que somente no grupo C, o defeito ósseo não recebeu nenhum tipo de material, ficando apenas preenchido pelo coágulo sanguíneo proveniente da própria ferida óssea. Nos demais grupos, os defeitos ósseos foram preenchidos pelos materiais nas proporções indicadas no Quadro 2.

Quadro 2 - Grupos experimentais e materiais de preenchimento

Grupo experimental	Material de preenchimento
Controle (C)	Coágulo
Amido (Am)	Amido
Residronato 0,25 mol (Res 0,25)	Residronato + amido
Residronato 0,5 mol (Res 0,50)	Residronato + amido
Residronato 0,75 mol (Res 0,75)	Residronato + amido
Residronato 1 mol (Res 1)	Residronato

O residronato sódico foi cedido pela Farmácia Escola da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara - UNESP.

Todos os grupos experimentais foram divididos em dois subgrupos constituídos por cinco animais de acordo com os períodos de observação. A eutanásia dos animais de cada um dos subgrupos foi realizada nos períodos de sete e 21 dias após a cirurgia.

4.3 Cálculo dos materiais

O cálculo das proporções percentuais dos materiais foi realizado de acordo com o peso molecular (PM) do residronato. O PM do residronato de sódio é 305,09 g/mol. Desta forma, para que as quantidades em peso dos grupos ficassem semelhantes, houve a necessidade de adicionarmos amido de milho, pois este material considerado inerte, serviu para completar as dosagens necessárias dos grupos experimentais que receberam residronato. 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 não interfere de qualquer forma na reparação óssea.

As quantidades em peso dos materiais foram calculadas utilizando-se 0,01 mol para adequação das quantias volumétricas apropriadas ao tamanho do defeito ósseo. Desta maneira, as proporções percentuais das substâncias foram mantidas e estão expressas no Quadro 3.

Quadro 3 - Porcentagem e peso dos materiais utilizados

Material	% do material peso em gramas	% de amido	% total
Residronato 0,25 mol	25% 0,76 g	75% 2,29 g	100%
Residronato 0,50 mol	50% 1,52 g	50% 1,53 g	100%
Residronato 0,75 mol	75% 2,28 g	25% 0,77 g	100%
Residronato 1 mol	100% 3,05 g	0%	100%

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

4.4 Procedimentos cirúrgicos

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

procedimento. Todo o instrumental e campos cirúrgicos foram adequadamente esterilizados.

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

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

O defeito ósseo foi realizado na região de maior extensão látero-lateral da diáfise do fêmur esquerdo, na sua porção distal. O defeito foi confeccionado utilizando uma broca trefina, medindo 2 mm de diâmetro interno e 2,5 mm de diâmetro externo, montada em motor tipo chicote, sob abundante irrigação com soro fisiológico (NaCl 0,9%). A broca foi posicionada perpendicularmente ao longo eixo do fêmur e o osso compacto da cortical óssea anterior do fêmur foi cortado de forma circular.

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

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

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

4.5 Eutanásia

Para a eutanásia dos animais foi utilizada anestesia geral em dose excessiva, esta foi realizada decorridos sete e 21 dias da data da cirurgia. O fêmur esquerdo foi retirado e o tecido mole excedente foi cuidadosamente removido. As peças ósseas foram fixadas em uma solução de formol a 10%, permanecendo armazenadas em frascos de vidro, separadas de acordo com o grupo experimental, o tempo de observação.

4.6 Análise dos resultados

Os fêmures esquerdos, depois de fixados na solução de formol a 10%, foram descalcificados em solução de EDTA durante aproximadamente 90 dias. As peças ósseas foram aparadas, preparadas para a inclusão em parafina e submetidas à técnica histológica de rotina.

Foram realizados cortes transversais do defeito ósseo, com aproximadamente 5 μ m de espessura. As secções foram realizadas em toda a extensão do defeito ósseo de forma semi-seriada. Assim, foram confeccionadas dez lâminas de cada peça óssea, que posteriormente foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE - Merck & Co. Inc.) e analisadas sob a microscopia de luz (Zeiss Axiophot 2 - Carl Zeiss, Oberköchen, Alemanha).

4.6.1 Análise histológica

Foram realizadas avaliações histológicas com relação à neoformação óssea, à presença de trabéculas ósseas imaturas, à remodelação destas trabéculas, à remodelação óssea na superfície de corte, à presença de espaços medulares, bem como à resposta tecidual diante da implantação local do amido e do residronato de sódio no tecido ósseo dos fêmures das ratas.

4.6.2 Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica foi realizada com a utilização de um retículo quadriculado composto por cem pontos de intersecção resultantes das intersecções entre dez linhas verticais e dez linhas horizontais. Este retículo foi posicionado sobre o centro da imagem histológica do defeito ósseo, com um aumento original de cem vezes para a contagem. Foram considerados todos os pontos de intersecção que estavam sobrepostos à matriz óssea neoformada. A contagem foi realizada na região central do defeito ósseo a partir de fotografias

digitalizadas dos cortes histológicos, sendo que para cada animal, foram analisados seis cortes. Desta forma, foram analisados seiscentos pontos por animal. Para a planimetria por contagem de pontos foi utilizado o programa Image J (versão 1,32 para *Windows*, de domínio público, do Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, USA). Os valores numéricos obtidos da neoformação óssea foram transformados em porcentagem e submetidos à análise estatística.

4.7 Análise estatística

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 resultantes da análise histomorfométrica foram submetidos à estatística descritiva e à análise de variância (ANOVA), utilizando como nível de significância a margem de erro de 5%. Foram analisados os seis diferentes grupos experimentais (C, Am, Res 0,25, Res 0,50, Res 0,75 e Res 1), 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 teste de Tukey foram realizados com a utilização do *software* STATISTICA for *Windows* versão 5.5 (2000 – Analytical Software Co.).

5 RESULTADOS

5.1 Analise histológica

Os cortes de fêmures de ratas foram seccionados transversalmente na região onde foi confeccionado o defeito ósseo. Em todos os grupos foram encontrados os defeitos ósseos facilmente, pois estes apresentavam margens bem definidas. Em alguns cortes foi possível a visualização de quantidade variável de tecido muscular remanescente ao redor do fêmur e de periósteo circundando a superfície do osso cortical. Em nenhum dos períodos e tratamentos observados verificou-se junção perfeita do osso novo com as bordas corticais do defeito.

A descrição histológica dos espécimes foi realizada agrupando-se os diferentes períodos de observação, isto foi feito para facilitar a descrição das características semelhantes entre os cortes histológicos e possibilitar a comparação entre os diferentes grupos experimentais dentro do mesmo período de tempo.

5.1.1 Análise histológica – sete dias

Nos cortes histológicos realizados no período de sete dias em todos os grupos foi possível observar toda a extensão do osso cortical do fêmur, o canal medular, o local do defeito ósseo e suas superfícies de cortes. O canal medular estava preenchido por quantidade variável de medula óssea e células inflamatórias mono e polimorfonucleares. Estas células eram abundantes nos grupos que receberam residronato de sódio. Em todos os espécimes os defeitos foram encontrados facilmente com suas superfícies de corte nítidas (Figura 1 a-f).

Nos espécimes dos grupos C e Am as trabéculas ósseas neoformadas se anastomosavam ao longo do defeito ósseo, porém sem fechá-lo em extensão. O perióstio circundava toda a periferia do corte histológico, inclusive recobrimo o local do defeito ósseo (Figura 1 a, b).

As distribuições das trabéculas ósseas neoformadas dos grupos C e Am eram semelhantes. As trabéculas apresentavam-se com aspecto imaturo e os espaços medulares delimitados por essas trabéculas eram preenchidos por tecido conjuntivo frouxo e células com características osteogênicas. Ao redor das trabéculas eram observados osteoblastos ordenados em fileiras (Figura 2 a, b).

Os animais dos grupos tratados com residronato em todas as concentrações molares utilizadas apresentaram aspectos histológicos semelhantes entre si. O defeito ósseo revelou-se, geralmente, preenchido por coágulo sanguíneo em organização, composto por extensa rede de fibrina e células inflamatórias mono e polimorfonucleares, estando permeado por escassas áreas de tecido de granulação em formação (Figura 2 c). Alguns espécimes apresentaram trabéculas ósseas neoformadas, de aspecto imaturo, localizadas próximas as margens do defeito. Essas trabéculas eram delicadas, formadas por tecido osteóide e permeadas por tecido de granulação e remanescentes de coágulo. Em

alguns cortes, foi observada a presença de trabéculas ósseas neoformadas no interior do canal medular. Tais trabéculas eram separadas por espaços medulares preenchidos por tecido hematopoiético e infiltrado inflamatório misto (Figura 1 d, f; 2 c).

Nos grupos tratados com residronato de sódio, foi observada em alguns animais a presença de uma neoformação óssea na superfície externa do osso cortical. Esta neoformação óssea foi denominada em trabalhos anteriores de neoformação óssea extra-cortical subperiosteal (Fernandes, 2005; Canettieri et al., 2009). Sua localização era, geralmente nas áreas mais distantes da região do defeito em reparação. Essa neoformação óssea apresentava trabéculas separadas por espaços preenchidos por tecido semelhante ao hematopoiético presente no canal medular (Figura 1 e).

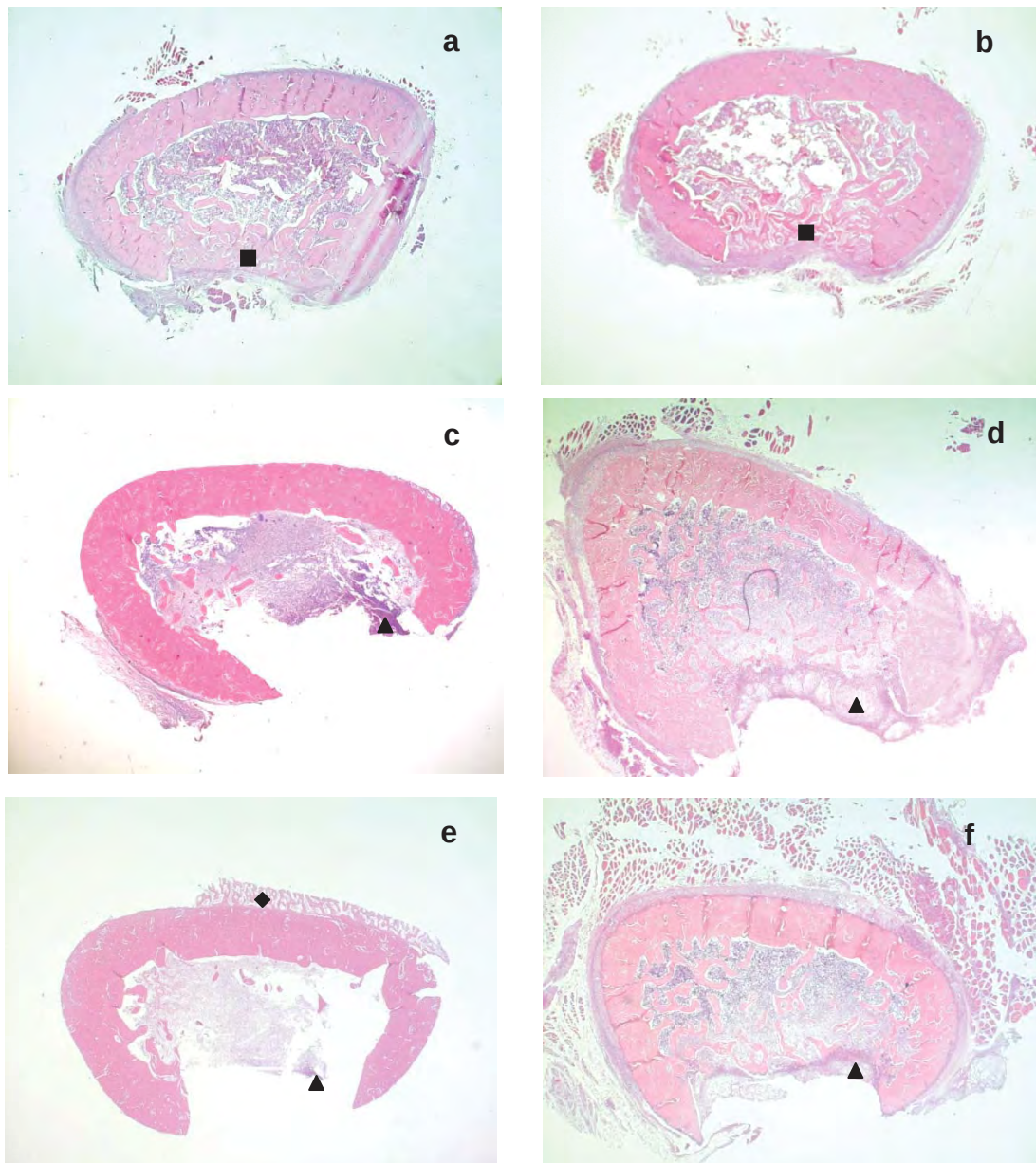


Figura 1- Período de sete dias (vista panorâmica dos defeitos experimentais): **a) grupo C:** fechamento linear por trabéculas ósseas neoformadas (■); **b) grupo Am:** defeito ósseo preenchido por trabéculas ósseas (■); **c) grupo Res 0,25:** defeito ósseo preenchido por rede de fibrina (▲); **d) grupo Res 0,50:** defeito ósseo preenchido por rede de fibrina (▲); **e) grupo Res 0,75:** área do defeito ósseo preenchida por rede de fibrina (▲). Neoformação óssea extra-cortical subperiosteal (◆); **f) grupo Res 1:** defeito ósseo preenchido por rede de fibrina (▲). Aumento original de 25x; HE.

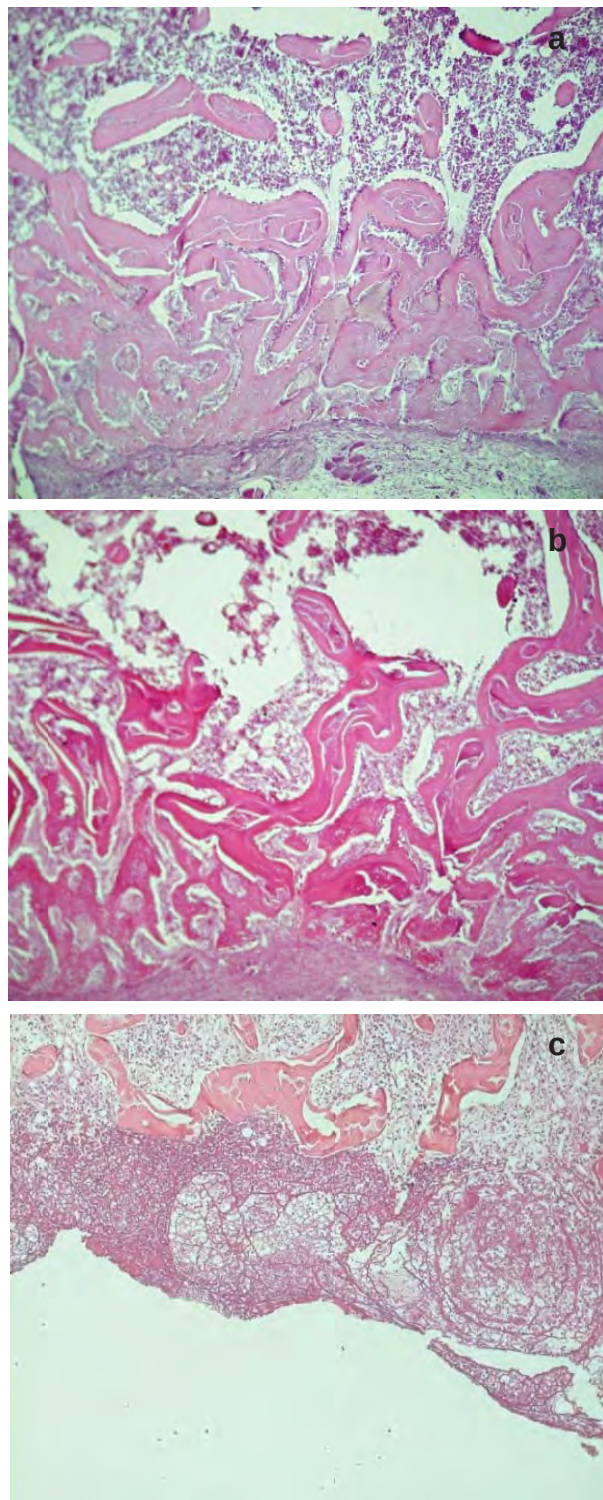


Figura 2- Período de 7 dias: **a) grupo C**: fechamento do defeito linear por tecido ósseo neoformado; **b) grupo Am**: fechamento do defeito com trabéculas ósseas imaturas; **c) grupo Res 0,50**: defeito ósseo preenchido por rede de fibrina. Aumento original de 100x; HE.

5.1.2 Análise histológica – 21 dias

As trabéculas ósseas formadas no interior do canal medular e na região do defeito ósseo apresentavam maior maturação no período de 21 dias, quando comparadas ao observado no período de sete dias. Além disso, notava-se uma redução do número de células inflamatórias, principalmente no local do defeito ósseo.

O grupo C apresentou o fechamento do defeito ósseo em toda sua extensão, com grande quantidade de trabéculas ósseas anastomosadas, unindo as margens do defeito em extensão e preenchendo toda a sua profundidade (Figura 3 a, 4 a).

No grupo Am, as anastomoses entre as trabéculas ósseas foram mais evidentes na superfície externa do defeito ósseo, sendo que na profundidade do defeito, estas eram mais esparsas e haviam espaços medulares mais amplos entre as trabéculas (Figura 3 b, 4 b).

Os animais dos grupos que receberam residronato (Res 0,25; Res 0,50; Res 0,75; Res 1) apresentaram um padrão histológico semelhante entre si. Não houve neoformação óssea significativa em todos os animais, sendo esta restrita às margens do defeito ósseo (Figura 3 c-f). A área do defeito ósseo apresentava-se preenchida por tecido de granulação em estágios de maturação variados. Esse tecido apresentava-se, na maioria dos cortes, bastante celularizado com poucas fibras colágenas e focos de células inflamatórias crônicas. A quantidade deste tecido foi variável entre os animais dos grupos experimentais que receberam residronato (Figura 4 c-f).

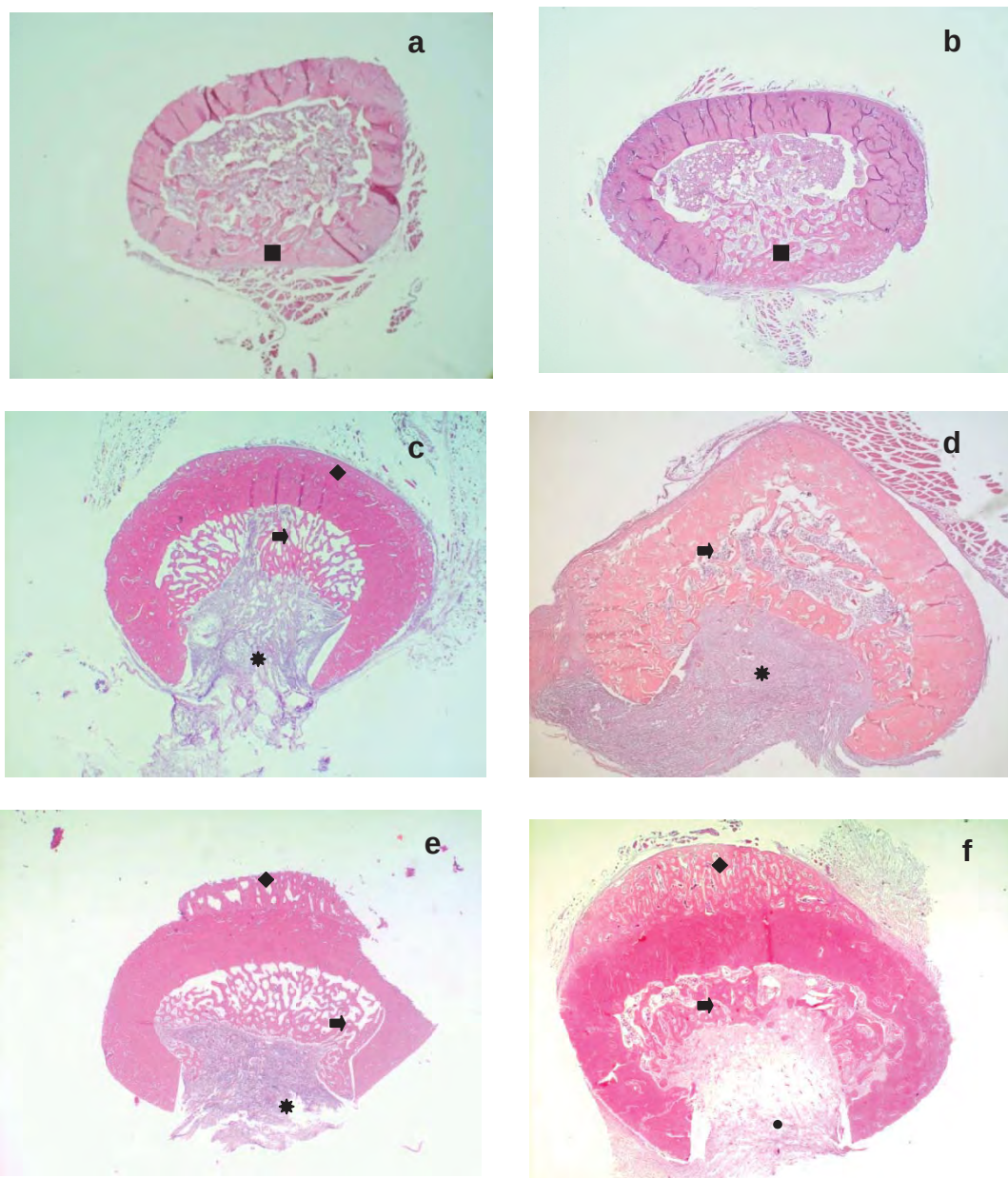


Figura 3 - Período de 21 dias (vista panorâmica dos defeitos experimentais): **a) grupo C:** fechamento em extensão por tecido ósseo neoformado (■); **b) grupo Am:** defeito ósseo preenchido por trabéculas ósseas (■); **c) grupo Res 0,25:** defeito ósseo preenchido por tecido conjuntivo (*). Neoformação óssea extra-cortical subperiosteal (♦). Trabéculas ósseas no canal medular (➡); **d) grupo Res 0,50:** defeito ósseo preenchido por tecido conjuntivo (*). Trabéculas ósseas no canal medular (➡); **e) grupo Res 0,75:** área do defeito ósseo preenchida por tecido conjuntivo (*), Trabéculas ósseas no canal medular (➡) Neoformação óssea extra-cortical subperiosteal(♦); **f) grupo Res 1:** defeito ósseo preenchido por tecido de granulação (●). Trabéculas ósseas no canal medular (➡). Neoformação óssea extra-cortical subperiosteal (♦). Aumento original de 25x; HE.

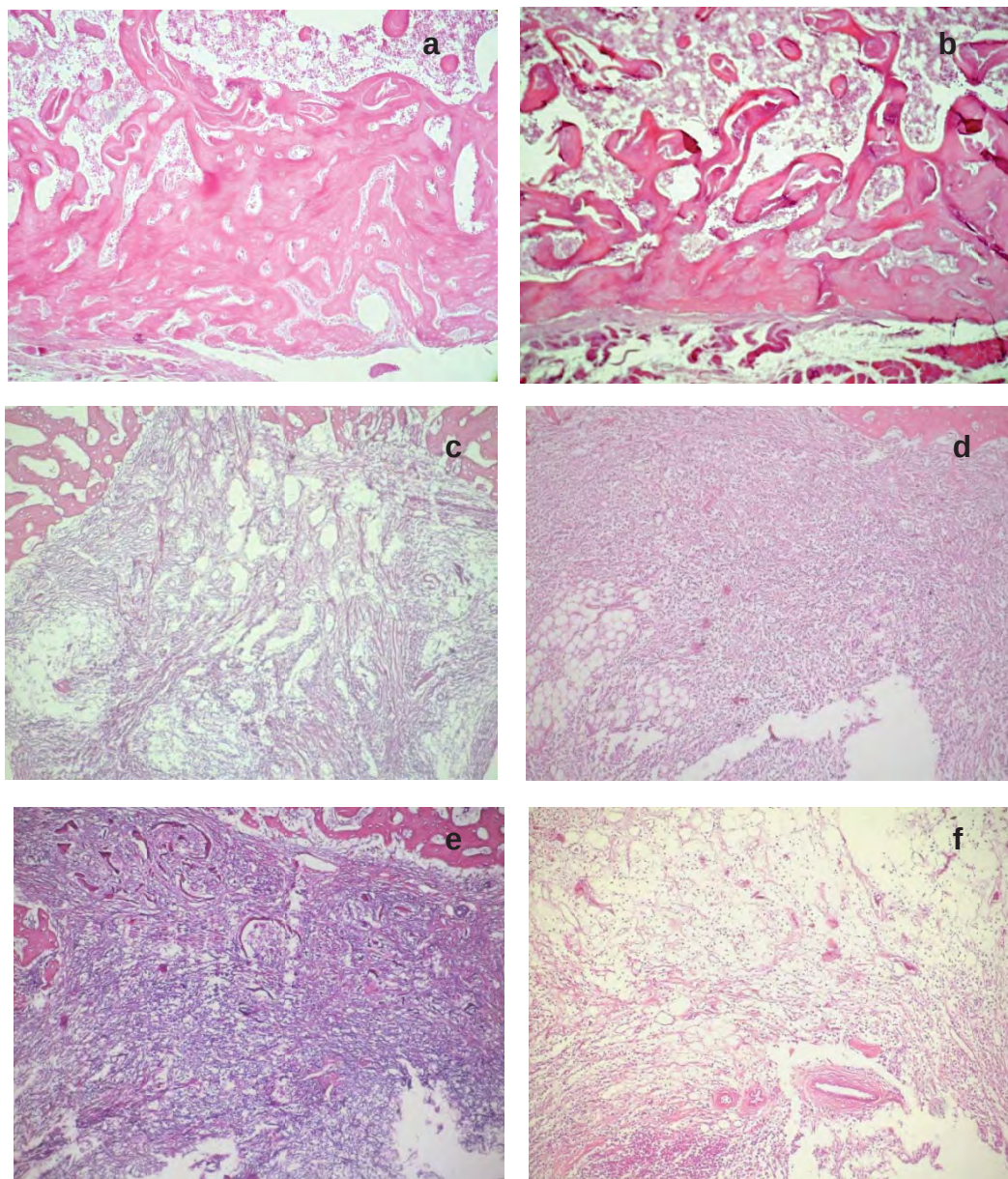


Figura 4 - Período de 21 dias: **a) grupo C:** fechamento do defeito em extensão por tecido ósseo neoformado; **b) grupo Am:** fechamento do defeito com trabéculas ósseas; **c) grupo Res 0,25:** defeito ósseo preenchido por tecido conjuntivo; **d) grupo Res 0,50:** defeito ósseo preenchido por tecido conjuntivo; **e) grupo Res 0,75:** defeito ósseo preenchido por tecido conjuntivo; **f) grupo Res 1:** defeito ósseo preenchido por tecido de granulação. Aumento original de 100x; HE.

A área do defeito ósseo nos animais que receberam residronato usualmente exibia trabéculas delicadas formadas por material de aspecto osteóide e em alguns cortes foram observadas trabéculas ósseas anastomosadas num estágio maior de maturação. Essas trabéculas construíam com o osso cortical antigo, de padrão lamelar, compacto e bem organizado. Não foram observados sinais de remodelação óssea nessas trabéculas neoformadas.

Em todos os animais dos grupos experimentais que receberam residronato foram observadas trabéculas ósseas no interior do canal medular. Estas trabéculas ósseas apresentavam osteócitos ora volumosos, ora pequenos contidos em lacunas de tamanhos variados. Tais trabéculas eram separadas por espaços medulares preenchidos predominantemente, por tecido hematopoiético (Figura 3 c-f). Em alguns espécimes foi observado o preenchimento de todo o canal medular por trabéculas ósseas anastomosadas que delimitavam espaços medulares.(Figura 5 a,b).

Na maioria dos animais dos grupos que receberam residronato de sódio, foi observada 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. Esta neoformação óssea apresentava trabéculas permeadas por espaços medulares e era revestida pelo perióstio. Era nítido o limite entre essa neoformação óssea extra-cortical e o osso cortical compacto maduro. Em alguns animais ocorreu a separação desses tecidos, na região de união (Figura 3 c,e,f; 5 c).

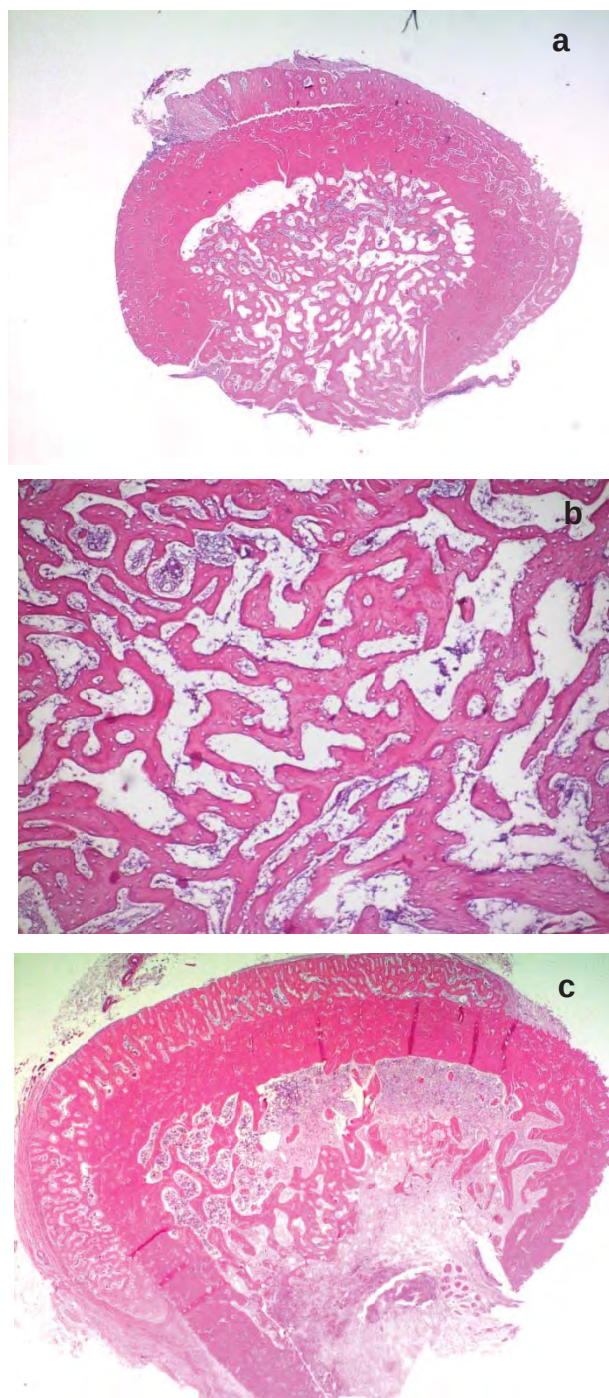


Figura 5 – Período de 21 dias: **a) grupo Res 0,75:** trabéculas ósseas preenchendo a região do defeito e todo o canal medular. Aumento original de 25x; **b) grupo Res 0,75:** mesmo espécime num aumento de 100x da região do defeito; **c) grupo Res 1:** mostrando a presença de neoformação óssea extra-cortical evidente. Aumento original de 25x HE.

5.2 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 1-6.

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	P(7)	P/600(7)	P(21)	P/600(21)
C	174	0,29	275	0,458
C	171	0,285	233	0,388
C	79	0,131	253	0,421
C	144	0,24	155	0,258
C	147	0,245	240	0,4
P/600 (média proporcional).				

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	P(7)	P/600(7)	P(21)	P/600(21)
Am	166	0,276	310	0,516
Am	157	0,261	204	0,34
Am	79	0,131	190	0,316
Am	144	0,24	151	0,251
Am	135	0,225	258	0,43

P/600 (média proporcional).

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 Res 0,25, nos períodos de sete e 21 dias

Grupo	P(7)	P/600(7)	P(21)	P/600(21)
Res 0,25	0	0	6	0,01
Res 0,25	0	0	85	0,141
Res 0,25	0	0	128	0,213
Res 0,25	0	0	195	0,325
Res 0,25	5	0,008	128	0,213

P/600 (média proporcional).

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 Res 0,50, nos períodos de sete e 21 dias

Grupo	P(7)	P/600(7)	P(21)	P/600(21)
Res 0,50	0	0	13	0,021
Res 0,50	0	0	35	0,058
Res 0,50	0	0	17	0,028
Res 0,50	0	0	13	0,021
Res 0,50	0	0	6	0,010

P/600 (média proporcional)

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 Res 0,75, nos períodos de sete e 21 dias

Grupo	P(7)	P/600(7)	P(21)	P/600(21)
Res 0,75	0	0	28	0,046
Res 0,75	0	0	71	0,118
Res 0,75	0	0	0	0
Res 0,75	0	0	2	0,003
Res 0,75	0	0	189	0,315

P/600 (média proporcional).

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 Res 1, nos períodos de sete e 21 dias

Grupo	P(7)	P/600(7)	P(21)	P/600(21)
Res 1	0	0	40	0,066
Res 1	0	0	0	0
Res 1	0	0	0	0
Res 1	0	0	31	0,051
Res 1	0	0	0	0

P/600 (média proporcional).

5.3 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 7 estão apresentados os resultados da estatística descritiva (média e desvio-padrão). A representação gráfica da análise estatística descritiva se encontra na Figura 6.

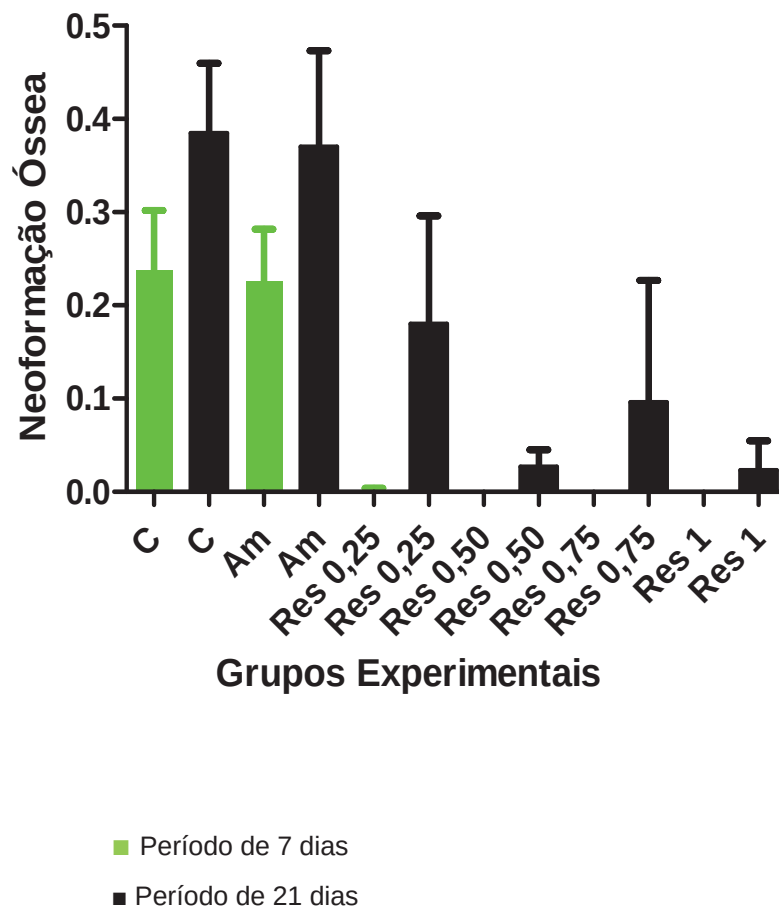


Figura 6- Gráfico das médias e desvio padrão dos grupos experimentais nos períodos de sete e 21 dias

Tabela 7 – Estatística descritiva referente aos grupos experimentais (C, Am, Res 0,25, Res 0,50, Res 0,75, Res 1) nos períodos de sete e 21 dias

Grupos	Período	Média	DP	N
C	7	0,238	0,064	5
Am	7	0,226	0,056	5
Res 0,25	7	0,001	0,003	5
Res 0,50	7	0,000	0,000	5
Res 0,75	7	0,000	0,000	5
Res 1	7	0,000	0,000	5
C	21	0,385	0,075	5
Am	21	0,370	0,103	5
Res 0,25	21	0,180	0,116	5
Res 0,50	21	0,027	0,018	5
Res 0,75	21	0,096	0,131	5
Res 1	21	0,023	0,032	5

Após a realização do teste ANOVA foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os períodos avaliados ($p=0,0000$), entre os grupos experimentais ($p=0,0000$), mas não na interação dessas duas variáveis ($p=0,0593$) (Tabela 8).

Tabela 8 – Análise de variância

Variáveis	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	P
Grupos	0,97110	5	0,19422	41,76	0,0000
Período	0,15862	1	0,15862	34,10	0,0000
Interação	0,05352	5	0,01070	2,3	0,0593
Erro	0,22326	48	0,00465		
Total	1,40651	59			

Uma vez que a análise de variância acusou diferenças estatisticamente significantes entre os fatores abordados (grupo experimental e período de observação), tornou-se necessária a aplicação do teste de Tukey a 5% (Tabela 9).

Tabela 9 – 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	C	21	0,3850
AB	Am	21	0,3706
ABC	C	7	0,2382
BC	Am	7	0,2266
C	Res 0,25	21	0,1804
CD	Res 0,75	21	0,0786
D	Res 0,50	21	0,0276
D	Res 1	21	0,0234
D	Res 0,25	7	0,0080
D	Res 1	7	0,0000
D	Res 0,50	7	0,0000
D	Res 0,75	7	0,0000

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

Analisando a Tabela 9, verificamos que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos C e Am nos períodos de sete e 21 dias. Não houve diferença estatística entre os dois períodos de estudo para os grupos Res 0,50, Res 0,75 e Res 1. Os grupos Res 0,25 e Res 0,75 de 21 dias não diferiram entre si, apesar do grupo Res 0,25 apresentar a maior média. Os grupos C e Am de 21 dias apresentaram os melhores resultados.

6 DISCUSSÃO

Nesse estudo utilizamos ratas como animal experimental, pois estes animais, além de apresentarem metabolismo acelerado que possibilita utilizar tempos mais curtos de observação, são de fácil manutenção. Várias pesquisas utilizam esse animal como modelo experimental para testar fármacos ou materiais, pois os tecidos desses são semelhantes aos dos humanos (Volpon et al., 2008; Mahl et al., 2009; Iwamoto et al., 2009; Pereira Alves et al., 2009). Para o estudo da regeneração óssea uma das metodologias mais utilizadas é o reparo de defeitos ósseos, pois ao contrário das fraturas, os defeitos são menos propensos a fatores mecânicos e obstruções do suprimento sanguíneo (Schenk, 1996). Nesta pesquisa elegemos essa metodologia, e para a realização dos defeitos nos fêmures utilizamos broca de aço trefina, tipo de instrumento rotatório que tem sido utilizado em outros trabalhos científicos (Jaime et al., 2005; Fernandes, 2005; Canettieri et al., 2009), pela facilidade de se padronizar o diâmetro das cavidades ósseas.

Na presente pesquisa, utilizamos o residronato de sódio, um aminobifosfonato, localmente nos defeitos ósseos, com a intenção de verificar o reparo e a neoformação óssea por meio de análises histológica e histomorfométrica. Embora o mecanismo básico de ação dos bisfosfonatos seja a sua capacidade de inibir a reabsorção óssea (Compston, 1994; Fleisch, 1998; Szejnfeld, 2000; Neves et al., 2003), por uma ação direta sobre os osteoclastos e por um efeito indireto mediado pelos osteoblastos que liberam inibidores do recrutamento e de atividade osteoclástica (Warner, 2000; Kulak; Bilezikian, 2000; Kwak et al., 2009), alguns trabalhos têm demonstrado que os bisfosfonatos apresentam outros efeitos como controle da proliferação e diferenciação osteoblástica

e, regulam a secreção de várias citocinas e fatores de crescimento (Giuliani et al., 1998; Knoch et al., 2005). Além disso, os bisfosfonatos podem regular a expressão de alguns genes relacionados com a formação óssea (Valenti et al., 2010; Zhou et al., 2011; Wang; Stern, 2011). Todos esses achados apoiam a hipótese de que os bisfosfonatos também apresentam atividade anabólica no tecido ósseo.

Neste estudo utilizamos como unidade, para dosar as substâncias, massa molecular e mol. Isto foi feito porque assim disponibilizamos a molécula de residronato de sódio no interior da cavidade óssea. Esta metodologia já foi utilizada em outros trabalhos com alendronato de sódio (Fernandes, 2005; Komatsu et al., 2008; Canettieri et al., 2009). Utilizamos o residronato de sódio em diferentes concentrações molares. Dessa forma, para que as quantidades em peso dos grupos fossem semelhantes, houve a necessidade de adicionarmos o amido que é uma substância inerte ao residronato. Além disso, em outros trabalhos foi mostrado que o amido não influencia no processo de reparação óssea (Fernandes 2005; Canettieri et al., 2009).

Com relação ao uso local de bisfosfonatos vários trabalhos na literatura demonstraram que essa via também é eficaz (Adachi et al., 1994; Meraw et al., 1999; Yaffe et al., 2000; Levin et al., 2001; Shibata et al., 2004; Kajiwara et al., 2005; Menezes et al., 2005; Komatsu et al., 2008). Além disso, reações adversas, embora raras, são mais frequentes com o uso de bisfosfonatos por via oral ou intravenosa, e a grande maioria dos casos de osteonecrose associada ao uso de bisfosfonatos é de pacientes que foram tratados com bisfosfonato intravenoso (Ruggiero et al., 2004; Marx et al., 2007; Yarom et al., 2007).

O residronato de sódio é um medicamento utilizado no tratamento da osteoporose humana. Trabalhos científicos utilizaram uma amostra significativa de pacientes com osteoporose que faziam tratamento com residronato e constataram diminuição de fraturas vertebrais e aumento da densidade mineral óssea (Watts et al., 2003;

Chevalier et al., 2010). No entanto, Senra (2009) estudando o reparo ósseo de defeitos cirúrgicos, em ratas ovariectomizadas, observou que o residronato aumentou os valores de microdureza e de módulo de elasticidade mas, atrasou a remodelação do calo ósseo. Devido a este fato, alguns autores acreditam que isto pode impedir a reparação de microlesões o que poderia ocasionar uma diminuição das propriedades biomecânicas do osso (Mashiba et al., 2000; Mashiba et al., 2001; Turner, 2002). Esta hipótese, entretanto, difere dos estudos de Allen et al. (2006), que observaram um aumento no número de microlesões em vértebras de cães tratados com residronato, mas não encontraram correlação deste dado com nenhuma alteração na propriedade mecânica do osso.

Há estudos com ratas osteoporóticas induzidas por glicocorticóides, que avaliaram a ação do residronato sobre o tecido ósseo. Balooch et al. (2007) e Iwamoto et al. (2009) perceberam que o residronato, por via subcutânea, impediu as mudanças locais no tecido ósseo que são induzidas por glicocorticóides. Mahl et al. (2009) também administraram residronato, por via subcutânea, e observaram que o residronato recupera a proporção de trabéculas ósseas diminuídas pela ação do glicocorticóide.

Estudos experimentais em animais avaliaram os efeitos do residronato na reparação óssea de defeito cirurgico e os resultados obtidos mostraram que este fármaco não exerceu efeito estimulador sobre o reparo ósseo (Piai et al., 2005; Senra, 2009). Já Oliveira et al. (2004) e Ferreira Junior et al. (2008) administrando residronato, por via oral, em animais com fraturas em tíbias obtiveram resultados favoráveis: O residronato contribuiu para a formação de tecido ósseo maduro e de qualidade.

Os resultados obtidos na presente pesquisa demonstraram que a aplicação local do residronato de sódio, não favoreceu o processo de formação óssea no local do defeito cirúrgico. No entanto, foi observada a presença de uma neoformação óssea na

superfície externa do osso cortical. Esta neoformação óssea foi denominada em trabalhos anteriores de neoformação óssea extra-cortical subperiosteal (Fernandes, 2005; Canettieri et al., 2009). Essa neoformação óssea extra cortical ficava localizada, geralmente, na região oposta ao defeito ósseo, na maioria dos animais dos grupos experimentais, principalmente no período de 21 dias. Além disso, foi observada nos animais tratados com residronato, a formação de trabéculas ósseas no interior do canal medular, sendo que em alguns espécimes essas trabéculas ósseas preenchiam totalmente o canal medular. Tais características também foram observadas em outros trabalhos com o uso local de alendronato sódico (Fernandes, 2005; Canettieri et al., 2009) e com residronato de sódio por via sistêmica (Senra, 2009). Essas formações ósseas, extra-cortical e no interior do canal medular, podem encontrar respaldo no trabalho de Reinholz et al. (2000), que estudando a ação de vários bisfosfonatos em cultura de medula óssea de fetos humanos, verificaram uma ação metabolicamente positiva desse fármaco sobre a medula óssea com aumento de diferenciação e das atividades formadoras de osso pelos osteoblastos. Porém, verificaram também, que concentrações muito altas desses fármacos diminuiriam a proliferação osteoblástica.

Os efeitos dos bisfosfonatos sobre os osteoblastos são complexos. Alguns bisfosfonatos estimulam a proliferação e diferenciação de osteoblastos, enquanto outros tem efeito inibitório. Além disso, um efeito dependente de dosagem tem sido relatado por vários autores que pesquisaram diferentes concentrações de bisfosfonatos sobre células osteoblásticas (Reinholz et al., 2000; Corrado et al., 2010; Wang; Stern, 2011).

Acreditamos, baseados em outros trabalhos da literatura (Giuliani et al., 1998; Reinholz et al., 2000; Corrado et al., 2010; Wang; Stern, 2011; Zhou et al., 2011), que concentrações elevadas de residronato de sódio na região do defeito cirúrgico podem ter afetado a

viabilidade dos osteoblastos, prejudicando a sua capacidade proliferativa e consequentemente a neoformação óssea. Contudo, devido a distribuição do fármaco pela corrente sanguínea uma menor quantidade de suas moléculas podem ter atingido sítios mais distantes da região do defeito favorecendo a neoformação óssea extra-cortical subperiosteal.

Não encontramos, nos animais dos grupos tratados com residronato no período de sete dias, praticamente nenhuma formação óssea no local do defeito cirúrgico, sendo este local preenchido por uma rede de fibrina e infiltrado inflamatório misto. Este achado demonstra que o residronato de sódio em todas as concentrações molares retardou a reparação óssea, quando comparado ao grupo controle e amido em que podiam ser observadas algumas trabéculas ósseas imaturas nesse mesmo período observado. Dados semelhantes foram observados por Piaí et al. (2005), demonstrando que o residronato não favoreceu a reparação óssea de defeitos cirúrgicos realizados em fêmures de ratos.

Analisando qualitativamente nossos resultados, observamos que, em ambos os períodos estudados, comparando as médias de neoformação óssea dos grupos experimentais, as maiores médias de neoformação óssea ocorreram nos grupos controle e amido. Em relação aos grupos que receberam residronato, apesar de não serem diferentes estatisticamente, no período de 21 dias, observamos que a maior média foi a do Res 0,25. Este nosso resultado é semelhante ao de outros trabalhos da literatura nos quais os melhores resultados obtidos foram dos grupos com menores concentrações de bisfosfonatos, onde foram observados maiores proliferações de células osteogênicas (Giuliani et al., 1998; Zhou et al., 2011). No entanto, esse resultado diferiu dos achados de Corrado et al. (2010), que relataram não terem observado nenhum efeito do zoledronato, um bisfosfonato da terceira geração, na proliferação de células osteogênicas com baixas concentrações (10^{-10} e 10^{-8}). Mas, observaram que em concentrações de 10^{-7} o zoledronato estimulou a proliferação celular. Por outro lado, concentrações superiores

a 10^{-7} reduziram significativamente a proliferação celular de maneira dose-dependente.

Há dificuldade de se justificar a ausência de formação de ponte óssea na maioria dos espécimes dos grupos tratados com residronato em diferentes concentrações molares, principalmente no período de 21 dias, quando o grupo controle já exibia fechamento ósseo em extensão na região do defeito. Possivelmente, o uso local do residronato no defeito cirúrgico tenha ocasionado um efeito tóxico sobre as células responsáveis pelo processo de reparação por tecido ósseo. Além disso, o residronato pode ter retardado a formação do tecido de granulação, fundamental para a sequência desse processo, devido ao efeito inibitório dos bisfosfonatos sobre a angiogênese (Santini et al., 2002; Zervas et al., 2006)

Os resultados encontrados neste trabalho, com relação à utilização local do residronato de sódio em diferentes concentrações molares, são difíceis de serem comparados e discutidos, uma vez que na literatura os trabalhos que utilizaram metodologia semelhante diferiram no fármaco, pois pesquisaram o alendronato de sódio (Yaffe et al., 1997; Shibata et al., 2004; Fernandes, 2005; Canettieri et al., 2009). Atualmente, ainda não se encontram na literatura trabalhos com o uso local de residronato em diferentes concentrações molares em defeitos ósseos.

Apesar da ação local do residronato de sódio na região do defeito não ter favorecido o processo de reparação por tecido ósseo, acreditamos que este fármaco possa ter ação anabólica neste tecido, devido à neoformação óssea subperiosteal e a formação de trabéculas ósseas no interior do canal observados na maioria dos animais tratados com residronato. Para compreendermos melhor esses achados, mais trabalhos com metodologias semelhantes e técnicas aprimoradas deverão ser realizados.

7 CONCLUSÃO

Baseados nos resultados obtidos nesse trabalho podemos concluir que:

- a) O amido não interferiu no reparo ósseo nos fêmures de ratas nos dois períodos de observação;
- b) O residronato de sódio em todas as concentrações utilizadas prejudicou a neoformação óssea no local do defeito;
- c) Evidenciou-se uma neoformação óssea extra-cortical subperiosteal na maioria dos animais dos grupos experimentais, onde o residronato de sódio foi usado, principalmente no período de 21 dias.

8 REFERÊNCIAS*

Adachi H, Igarashi K, Mitani H, Shinoda H. Effects of topical administration of a bisphosphonate (risedronate) on orthodontic tooth movement in rats . J Dent Res.1994;73:1478-86.

Advisory Task Force on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. J Oral Maxillofac Surg. 2007;65(3):369-76.

Allen MR, Iwata K, Phipps R, Burr DB. Alterations in canine vertebral bone turnover, microdamage accumulation, and biomechanical properties following 1-year treatment with clinical treatment doses of risedronate or alendronate. Bone. 2006 Oct;39(4):872-9.

Bagan JV, Murillo J, Jimenez Y, Poveda R, Milian MA, Sanchis JM, et al. Avascular jaw osteonecrosis in association with cancer chemotherapy series of 10 cases. J Oral Pathol Med. 2005;34(2):120-3.

Balooch G, Yao W, Ager WJ, Balooch M, Nalla KR, Porter AE, et al. The aminobisphosphonate risedronate preserves localized mineral and material properties of bone in the presence of glucocorticoids. Arthritis Rheum. 2007 Nov;56(11):3726-37.

*Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bedogni A, Blandamura S, Lokmic Z, Palumbo C, Ragazzo M, Ferrari F, et al. Bisphosphonate-associated jaw bone osteonecrosis: a correlation between imaging techniques and histopathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 Mar;105(3):358-64.

Bikle DD. Agentes que afetam a homeostasia do mineral ósseo. In: Katzung BG. *Farmacologia básica e clínica.* Trad. F.D. Mundim. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1998. Cap.41, p. 498-590.

Blank MA, Ems BL, Gibson GW, Myers WR, Berman SK, Phipps RJ, et al. Nonclinical model for assessing gastric effects of biphosphonates. *Dig Dis Sci.* 1997 Feb;42(2):281-8.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003 May;423:337-42.

Brooks JK, Gilson AJ, Sindler AJ, Ashman SG, Schwartz KG, Nikitakis NG. Osteonecrosis of the jaws associated with use of risedronate: report of 2 new cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007 Jun;103(6):780-6.

Buser D. *Guided bone regeneration in implant dentistry.* Chicago: Quintessence Books; 1994 265p.

Canettieri ACV, Colombo CED, Faig-Leite H, Chin MC. Femur bone repair in ovariectomized rats under the local action of alendronate, hydroxyapatite and the association of alendronate and hydroxyapatite. *Int. J. Exp. Path.* 2009;90:520-6.

Carter G, Goss AN, Doecke C. Bisphosphonates and avascular necrosis of the jaw: a possible association. *Med J Aust.* 2005 Apr;182(8):413-5.

Chevalier Y, Quek E, Borah B, Gross G, Stewart J, Lang T, et al. Biomechanical effects of teriparatide in women with osteoporosis treated previously with alendronate and risedronate: Results from quantitative computed tomography-based finite element analysis of the vertebral body. *Bone.* 2010 Jan;41:41-8.

Compston JE. The therapeutic use of bisphosphonates [Fortnightly review]. *BMJ*. 1994 Sept;309(6956):711-5.

Corrado A, Neve A, Maruotti N, Gaudio A, Marucci A, Cantatore FP. Dose dependent metabolic effect of zoledronate on primary human osteoblastic cell cultures. *Clin Exp Rheumatol*. 2010 Nov-Dec;28(6):873-9. Epub 2011 Jan 3

Curvello VP, Okamoto T, Milanezi LA. Efeito do antiinflamatório não-esteroidal Rofecoxib (Vioxx®) no processo de reparo ósseo em tíbias de ratos estressados: estudo microscópico. *RGO*. 2008 Jul/Set;56(3):309-14.

Ferreira Júnior DB, Pinto AS, Del Carlo RJ, Fonseca CC, Oliveira TT, Cardoso CA, et al. Efeitos de bifosfonatos e estatinas na reparação de fraturas em tíbias de ratas com osteoporose induzida com dexametasona. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl*. 2008;29(2):203-9.

Fernandes RG. Estudo da ação local do alendronato sódico, da hidroxiapatita e da associação do alendronato sódico com a hidroxiapatita, no reparo ósseo de fêmures de ratos. [Tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos: UNESP - Univ Estadual Paulista; 2005.

Fernández NP, Fresco RE, Urizar JMA. Bisphosphonates and oral pathology I: general and preventive aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006 Aug;11(5):396-400.

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

Giuliani N, Pedrazzoni M, Negri G, Passeri G, Impicciatore M, Girasole G. Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures in vitro and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo. *Bone*. 1998 May;22(5):455-61.

González EB, Nieto VG. Uso de bisfosfonatos en la infancia. *BSCP Can Ped*. 2005 May/Aug;29(2):7-12.

Hansen T, Kunkel M, Weber A, James Kirkpatrick C. Osteonecrosis of the jaws in patients treated with bisphosphonates: histomorphologic analysis in comparison with infected osteoradionecrosis. *J Oral Pathol Med*. 2006 Mar;35(3):155-60.

Hirabayashi H, Fujisaki J. Bone-specific drug delivery systems: approaches via chemical modification of bone-seeking agents. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(15):1319-30.

Iwata K, Li J, Follet H, Phipps RJ, Burr DB. Bisphosphonates suppress periosteal osteoblast activity independently of resorption in rat femur and tibia. *Bone*. 2006 Nov;39(5):1053-8.

Iwamoto J, Matsumoto H, Takeda T, Sato H, Yeh KJ. Comparison of the effect of vitamin K2 and risedronate on trabecular bone in glucocorticoid-treated rats: A bone histomorphometry study. *Yonsei Med J*. 2009 Apr;50(2):189-94.

Iwamoto J, Takeda T, Sato Y, Matsumoto H. Effects of risedronate on osteoarthritis of the knee. *Yonsei Med J*. 2010 March;51(2):164-170.

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

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 495p.

Kajiwara H, Yamaza T, Yoshinari M, Goto T, Iyama S, et al. The bisphosphonate pamidronate on the surface of titanium stimulates bone formation around tibial implants in rats. *Biomaterials*. 2005;26:581-7.

Kanatsu K, Aihara E, Okayama M, Kato S, Takeuchi K. Mucosal irritative and healing impairment action of risedronate in rat stomachs: comparison with alendronate. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004 May;19(5):512-20.

Kawak HB, Kim JY, Kim KJ, Choi MK, Kim JJ, Kim KM, et al. Risedronate Directly Inhibits Osteoclast Differentiation and Inflammatory Bone Loss. *Biol. Pharm. Bull.* 2009 July;32(7):1193-8.

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

Kulak C, Bilezikian J. Bisfosfonatos: características e utilização na osteoporose. In: Bandeira, F. et al. *Osteoporose*. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. p.351-72.

Landesberg R, Cozin M, Cremers S, Woo V, Kousteni S, et al. Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008 May;66(5):839-47.

Lehenkari PP, Kellinsalmi M, Napankangas JP, Ylitalo KV, Monkkonen J, et al. Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. *Mol Pharmacol.* 2002 May;61(5):1255-62.

Leu CT, Luegmayr E, Freedman LP, Rodan GA, Reszka AA. Relative binding affinities of bisphosphonates for human bone and relationship to antiresorptive efficacy. *Bone.* 2006 May;38(5):628-36.

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

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

Mahl CRW, Tonietto A, Giorgi BG, Girotto CV, Fontanella VRC. Avaliação da densidade radiográfica e da proporção trabecular do fêmur de ratas medicadas com glicocorticóide e bisfosfonato. *Rev. odonto ciênc.* 2009;24(1):28-31.

Marx RE, Cillo JE, Ulloa JJ. Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007 Dec;65(12):2397-410.

Mashiba T, Hirano T, Turner CH, Forwood MR, Johnston CC, Burr DB. Suppressed bone turnover by biphosphonates increases microdamage accumulation and reducer some biomechanical properties in dog rib. *J Bone Miner Res*. 2000 Apr;15(4):613-20.

Mashiba T, Turner CH, Hirano T, Forwood MR, Johnston CC, Burr DB. Effects of suppressed bone turnover by bisphosphonates on microdamage accumulation and biomechanical properties in clinically relevant skeletal sites in beagles. *Bone*. 2001 May;28(5):524-31.

Menezes AMA, Rocha FAC, Chave HV, Carvalho CBM, Ribeiro RA, Brito GAC. Effect of sodium alendronate on alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2005 Nov;76(11):1901-9.

Meraw SJ, Reeve CM, Wollan PC. Use of alendronate in peri-implant defect regeneration. *J Periodontol*. 1999 Feb;40(2):151-8.

Migliorati CA. Bisphosphonate-associated oral osteonecrosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;99(2):135.

Neves CL, Dias CB, Moysés RMA, Jorgetti V. Revisão: há espaço para o uso dos bisfosfonatos na osteodistrofia? *J Bras Nefrol*. 2003;25(4):215-23.

Oliveira LAA, Guarniero R, Rodrigues CJ, Santana PJ, Batista MA. Avaliação do efeito do risedronato sódico na consolidação de fraturas: estudo experimental em ratos. *Acta Ortop Brás*. 2004 Abr/Jun;12(2):77-83.

Pereira Alves FR, Dutra RC, Olímpio TCR, Muller SS, Palacio EP. Efeito do ácido zoledrônico em tíbias de ratas ooforectomizadas: Estudo prospectivo e randomizado. *Rev Bras Ortop*. 2009; 44(1):61-8

Piai CR, Carvalho VAP, Werkman C, Anbinder AL, da Rocha RF. Efeitos do risedronato na reparação óssea de ratos machos e fêmeas com osteopenia. Cienc Odontol Bras. 2005; 8(3):77-82.

Pinheiro ALB, Gerbi ME. Photoengineering of bone repair processes. Photomed Laser Surg. 2006; 21:169-78.

Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. Dissociation of the pro-apoptotic effects of bisphosphonates on osteoclasts from their anti-apoptotic effects on osteoblasts/osteocytes with novel analogs. Bone. 2006;39:443-52.

Plotkin LI, Bivi N, Bellido T. A bisphosphonate that does not affect osteoclasts prevents osteoblast and osteocyte apoptosis and the loss of bone strength induced by glucocorticoids in mice. Bone. 2011 Jul;49(1):122-7. Epub 2010 Aug 22.

Rang HP, Dale MM. Metabolismo ósseo. In: Farmacologia. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. Cap.30, p.509-18.

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

Reszka AA. Mecanismos de acción e los bisfosfonatos. In: Moral JAR, Macías, JG. Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral. 2004:175-81.

Rodan GA, Reszka AA. Osteoporosis and bisphosphonates. J Bone Joint Surg Am. 2003;85-A (Suppl.3):8-12.

Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. Cancer supplement. 2000 Jun;88(12):2961-78.

Ruggiero SI, Mehrotra M, Rosenberg T, Engroff S. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004 May;62(5):527-34.

Ruggiero SL, Gralow J, Marx RE, Hoff AO, Schubert MM, Hurn JM, et al. Practical guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with cancer. *J Clin Oncol Pract* 2006;2:7-14.

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

Russell RGG. Determinants of structure–function relationships among bisphosphonates. *Bone.* 2007;40:21-5.

Santini D, Vincenzi B, Avvisati G, Dicuonzo G, Battistoni F, et al. Pamidronate induces modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2002 May;8(5):1080-4.

Schenk RK. Regeneração óssea: bases biológicas. In: Buser D, Dahlin C, Schenk RK. Regeneração óssea guiada na implantodontia. São Paulo: Quintessence, 1996. Cap.3, p. 49-100.

Senra GS Avaliação da qualidade óssea no reparo de defeitos ósseos sob a ação do risedronato e da deficiência estrogênica [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos: UNESP - Univ Estadual Paulista; 2009.

Shibata T, Komatsu K, Shimada A, Shimoda S, Oida S, Kawasaki K, et al. Effects of alendronate on restoration of biomechanical properties of periodontium in replanted rat molars. *J Periodont Res.* 2004;39:405-14.

Stepan JJ, Alenfeld F, Boivin G, Feyen JH, Lakatos P. Mechanisms of action of antiresorptive therapies of postmenopausal osteoporosis. *Endocr Regul.* 2003 Dec;37(4):225-38.

Stepensky D, Kleinberg L, Hoffman A. Bone as an effect compartment: models for uptake and release of drugs. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(10):836-8.

Szejnfeld VL. Osteoporose: diagnóstico e tratamento. São Paulo: Sarvier, 2000.

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

Townbridge HO, Emling RC. Inflamação: uma revisão do processo. 4.ed. São Paulo: Santos, 1996. 172p.

Turner CH. Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality. *Osteoporos Int*. 2002;13(2):97-104.

Valenti MT, Giannini S, Donatelli L, Zanatta M, Bertoldo F, Sella S, et al. The effect of risedronate on osteogenic lineage is mediated by cyclooxygenase-2 gene upregulation. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(4):R163. Epub 2010 Aug 25.

Volpon JB, Cecim PES, Miyase CI, Gava NF. O alendronato de sódio na prevenção da osteopenia secundária à imobilização gessada, em ratas: avaliação histomorfométrica. *Rev Bras Ortop*. 2008;43(10):442-51.

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

Wang J, Stern PH. Dose-dependent differential effects of risedronate on gene expression in osteoblasts. *Biochem Pharmacol*. 2011 Apr 15;81(8):1036-42. Epub 2011 Feb 15.

Warner W. Hormônios da hemostasia. In: Yagiela JA, Neidle EA, Down FJ. Farmacologia e terapêutica para dentistas. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. Cap.34, p. 434-54.

Watts NB, Josse RG, Hamdy RC, Hughes RA, Manhart MD, Barton I, et al. Risedronate prevents new vertebral fractures in postmenopausal women at high risk. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Feb;88(2):542-9.

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

Yaffe A, Golomb G, Breuer E, Binderman I. The effect of topical delivery of novel bisacylphosphonates in reducing alveolar bone loss in the rat model. *J Periodontol*. 2000 Oct;71(10):1607-12.

Yarom N, Yahalom R, Shoshani Y, Hamed W, Regev E, Elad S. Osteonecrosis of the jaw induced by orally administered bisphosphonates: incidence, clinical features, predisposing factors and treatment outcome. *Osteoporos Int*. 2007 Oct;18(10):1363-70.

Zervas K, Verrou E, Teleioudis Z, Vahtsevanos K, Banti A, Mihou D, et al. Incidence, risk factors and management of osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma: a single-centre experience in 303 patients. *Br J Haematol*. 2006 Sep; 134(6):620-3.

Zhou Q, Zhao ZN, Cheng JT, Zhang B, Xu J, Huang F, et al. Ibandronate promotes osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells by regulating the expression of microRNAs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Jan 7;404(1):127-32. Epub 2010 Nov 23.

ANEXO A - Certificado do comitê de ética em pesquisa

 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9037
Fax (12) 3947-9010 / sigetti@fosjo.unesp.br / Guadex@fosjo.unesp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **047/2009-PA/CEP**, sobre **“Estudo da ação local do risedronato de sódio no reparo ósseo de fêmures de ratas”** sob responsabilidade de **HORÁCIO FAIG LEITE**, tendo como orientada a aluna Jucely Aparecida da Rosa, 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, 09 de dezembro de 2009

Profa.Titular YASMIN RODARTE CARVALHO
Coordenadora