

**MÔNICA DAL PIAN NOBRE**

**AÇÃO LOCAL DO ALENDRONATO SÓDICO NO PROCESSO DE  
REPARAÇÃO ÓSSEA DE FÊMURES DE RATOS  
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)**

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

**MÔNICA DAL PIAN NOBRE**

**AÇÃO LOCAL DO ALENDRONATO SÓDICO NO PROCESSO DE  
REPARAÇÃO ÓSSEA DE FÊMURES DE RATOS  
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)**

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

Orientador: Prof. Titular Horácio Faig Leite

São José dos Campos

2006

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

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

**NOBRE, M.D.P. Ação local do alendronato sódico no processo de reparação óssea de fêmures de ratos espontaneamente hipertensos (SHR).** 2006. 116f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2006.

## **DEDICATÓRIA**

À minha família, em especial à minha mãe MARIA CRISTINA DAL PIAN e  
ao meu irmão LUIZ FERNANDO DAL PIAN NOBRE,  
pelo amor maior.

Em memória da minha irmã MARIA ANGÉLICA DAL PIAN NOBRE e do  
meu avô ARDUINO LUIZ DAL PIAN, meus fiéis anjos da guarda.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Meu agradecimento especial ao Professor Titular HORÁCIO FAIG LEITE por representar um exemplo de competência. Obrigada pela orientação segura desta dissertação e pela contribuição preciosa para a concretização deste sonho.

## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, na pessoa do seu Diretor Prof. Adj. PAULO VILLELA SANTOS JÚNIOR, pela oportunidade de estudar nesta Escola.

Ao Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, representado na pessoa da Profa. Adj. ANA SUELI RODRIGUES CAVALCANTE e a todos os professores e funcionários que tornaram possível a realização deste trabalho.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal Profa. Adj. ROSILENE FERNANDES DA ROCHA, pela forma como conduz o curso, tornando-o uma referência no cenário nacional.

Ao Prof. Adj. LUIZ EDUARDO BLUMER ROSA, pela forma atenciosa com que me recebeu nesta Escola, pela oportunidade de conviver e aprender.

À Profa. Adj. YASMIN RODARTE CARVALHO pelo incentivo à pesquisa científica e por mostrar-se sempre disponível.

À Profa. Dra. ADRIANA AIGOTTI HABERBECK BRANDÃO pelos ensinamentos de grande importância para a minha formação.

Ao Prof. Dr. JOSÉ BENEDITO OLIVEIRA AMORIM, pelo auxílio indispensável na obtenção dos animais.

À Profa. Dra. RAQUEL GUEDES FERNANDES, por mostrar-se sempre disponível em me auxiliar, pelos seus ensinamentos e pela amizade e convivência.

Aos Professores de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFRN, em especial à Profa. Dra LÉLIA BATISTA DE SOUZA, que se tornaram meu grande exemplo.

À Profa. Titular SUZANA ORSINI MACHADO DE SOUSA e a todos os funcionários da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da USP, por cederem espaço e condições para a realização do processo de descalcificação das peças no Laboratório de Patologia Cirúrgica desta Escola, meus sinceros agradecimentos.

À amiga Profa. Dra. ANA LIA ANBINDER, pela paciência em me transmitir todos os seus conhecimentos, pelo incentivo constante, por todos os conselhos e principalmente pela amizade sincera e companheirismo.

À Profa. Dra. JANETE DIAS ALMEIDA pela disponibilidade e pela grande contribuição na discussão deste trabalho.

À Divisão de Odontologia do GIA/SJ, em nome de seu Chefe Ten. Cel. JOSÉ FERNANDO REGATO PEREIRA e a todos os colegas de trabalho, pela confiança a mim atribuída e pelo suporte oferecido durante o decorrer do curso.

Ao Ten. Cel. JOSÉ NELSON RUECKER pelo apoio e incentivo constantes.

Ao Prof. Dr. CAMILO DALELES RENNÓ pela grande colaboração na análise estatística.

Ao funcionário PAULO ROGÉRIO MARTINS, da Disciplina de Anatomia, pela disponibilidade em ajudar e a tornar o trabalho mais fácil.

Aos funcionários do Biotério ANTÔNIO DOMINGOS SÁVIO BARBOSA MAIA VASCONCELOS e LOURIVAL JACOB, pela paciência e colaboração indispensáveis no tratamento dos animais.

Ao funcionário do Laboratório de Apoio à Pesquisa WALTER CRUZ, pela dedicação na confecção das lâminas histológicas.

À secretária do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, SÍLVIA SCARPEL pela disposição em ajudar sempre que preciso.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação ROSEMARY DE FÁTIMA SALGADO, ERENA MICHIE HASEGAWA e MARIA APARECIDA CONSIGLIO DE SOUZA por sua atenção no decorrer do curso.

Aos meus grandes amigos MARCELA FERRAZ CATRAMBY, RENATO MIQUELETO e DENNIA PEREZ pelo auxílio imprescindível nas etapas experimentais deste trabalho, pelo apoio e companheirismo incontestáveis.



Ao RICARDO TRAJANO SANDOVAL PEIXOTO, pela doçura de sua companhia e pelo carinho de todos os momentos.

Ao colega de Pós-Graduação ANTÔNIO CARLOS VICTOR CANETTIERI pela contribuição na execução desta pesquisa e pelo companheirismo.

Aos meus amigos de Pós-Graduação GISELLE, RODRIGO, PIETRO, FLÁVIA, FERNANDO e GRAZIELA pelo espírito de humanidade com que nos tratamos diariamente.

Por fim, mas não menos importante, o meu agradecimento aos amigos de todas as horas e que supriram, muitas vezes, a saudade da família distante.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1	Grupo alendronato 1mol
A2	Grupo alendronato 2mol
Am	Grupo amido
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
AVC	Acidente vascular cerebral
BMP-2	Proteína morfogenética óssea 2
C	Grupo controle
CFU-F	Unidade formadora de colônia para fibroblastos
CFU-OB	Unidade formadora de colônia para osteoblastos
DMO	Densidade mineral óssea
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DP	Desvio padrão
DXA	Dupla emissão de raios X
ECA	Enzima conversora da angiotensina
FAO	Fosfatase alcalina óssea
g	Gramas
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HE	Hematoxilina e eosina
hPTH(1,32)	PTH humano sintético
HVE	Hipertrofia ventricular esquerda
IL-1	Interleucina 1
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
ml	Mililitro

mmHg	Milímetros de mercúrio
mol	Mol
NIH	National Institute of Health
PA	Pressão arterial
PS	Pressão sangüínea
PTH	Hormônio paratireóideo
SD	<i>Sprague-Dawley</i>
SHR	Ratos espontaneamente hipetensos
SNS	Sistema nervoso simpático
SRA	Sistema renina angiotensina
TNF- $\alpha$	Fator de crescimento transformante $\alpha$
TRAP	Fosfatase ácida tartarato resistente
WKY	<i>Wistar Kyoto</i>
$\mu$ g	Microgramas

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Procedimentos cirúrgicos para a confecção do defeito ósseo no fêmur esquerdo dos ratos: a) incisão longitudinal na pele, após depilação e antissepsia; b) divulsão da camada muscular e afastamento dos tecidos moles; c) exposição do tecido ósseo após descolamento do perióstio; d) confecção do defeito ósseo de 2,5mm; e) preenchimento do defeito ósseo; f) sutura e antissepsia final..... 56
- FIGURA 2 - SHR machos, sete dias (vista panorâmica): **a) grupo C:** foco de hemorragia na área do defeito; **b) grupo Am:** hemorragia na área do defeito; **c) grupo A1:** rede de fibrina no conjuntivo preenchendo o defeito; **d) grupo A2:** rede de fibrina no defeito ósseo e tecido ósseo extra-cortical subperiosteal neoformado (→) HE. Aumento original de 25x..... 62
- FIGURA 3 - SHR machos, sete dias (centro do defeito): **a) grupo C:** tecido conjuntivo frouxo com foco de hemorragia na área do defeito (◆); **b) grupo Am:** áreas de hemorragia na área do defeito (◆) e deposição de matriz osteóide (→); **c) grupo A1:** rede de fibrina e degeneração hidrópica no tecido conjuntivo preenchendo o defeito; **d) grupo A2:** rede de fibrina na área do defeito ósseo (+). HE. Aumento original de 100x..... 64
- FIGURA 4 - SHR fêmeas, sete dias (vista panorâmica): **a) grupo C:** foco de hemorragia na área do defeito; **b) grupo Am:** ausência de hemorragia e presença de tecido conjuntivo na área do defeito; **c) grupo A1:** rede de fibrina no conjuntivo preenchendo o defeito e formação óssea extra-cortical subperiosteal (→) **d) grupo A2:** rede de fibrina na área do defeito ósseo e detalhe da formação óssea extra-cortical subperiosteal (→). HE. Aumento original de 25x..... 66

- FIGURA 5 - SHR fêmeas, sete dias (centro do defeito): **a) grupo C:** foco de hemorragia na área do defeito (→); **b) grupo Am:** tecido conjuntivo frouxo com deposição de fibras colágenas; **c) grupo A1:** rede de fibrina no conjuntivo preenchendo o defeito (◆); **d) grupo A2:** rede de fibrina (◆) e matriz osteóide na área do defeito ósseo (→). HE. Aumento original de 100x..... 68
- FIGURA 6 - SHR machos, 21 dias (vista panorâmica): **a) grupo C:** defeito ósseo fechado em extensão; **b) grupo Am:** anastomoses das trabéculas na superfície externa do defeito; **c) grupo A1:** trabéculas ósseas partindo do canal medular em direção ao defeito ósseo (◆); **d) grupo A2:** rede de fibrina na área do defeito ósseo e neoformação óssea extra-cortical (→). HE. Aumento original de 25x..... 70
- FIGURA 7 - SHR machos, 21 dias (centro do defeito): **a) grupo C:** trabéculas ósseas anastomosadas limitando espaços medulares com tecido conjuntivo frouxo **b) grupo Am:** tecido ósseo neoformado recoberto por perióstio na área do defeito ósseo (→); **c) grupo A1:** trabéculas ósseas imaturas e superfície externa da área do defeito ósseo recoberta por tecido conjuntivo fibroso; **d) grupo A2:** tecido conjuntivo, com áreas de hemorragia, deposição de fibras colágenas e tecido osteóide (→). HE. Aumento original de 100x..... 72
- FIGURA 8 - SHR fêmeas, 21 dias (vista panorâmica): **a) grupo C:** defeito ósseo fechado em extensão; **b) grupo Am:** trabéculas ósseas anastomosadas fechando todo o defeito; **c) grupo A1:** tecido conjuntivo na área do defeito e neoformação óssea extra-cortical subperiosteal (→); **d) grupo A2:** tecido conjuntivo na área do defeito e neoformação óssea extra-cortical subperiosteal (→). HE. Aumento original de 25x..... 74
- FIGURA 9 - SHR fêmeas, 21 dias (centro do defeito): **a) grupo C:** trabéculas ósseas anastomosadas delimitando espaços medulares; **b) grupo Am:** defeito ósseo fechado por tecido ósseo neoformado, recoberto por tecido conjuntivo fibroso (→); **c) grupo A1:** tecido conjuntivo na área do defeito; **d) grupo A2:** defeito preenchido por tecido conjuntivo frouxo. HE. Aumento original de 100x..... 76

- FIGURA 10 - Detalhes da neoformação óssea: **a)** formação de tecido ósseo extra-cortical subperiosteal aos sete dias nos grupos tratados com alendronato. Observar as trabéculas ósseas recobertas por perióstio (→) e em contato direto com a cortical óssea externa (◆); **b)** tecido ósseo extra-cortical subperiosteal aos 21 dias nos grupos tratados com alendronato. Tecido ósseo recoberto pelo perióstio (→) e em contato com a cortical óssea externa (◆); **c)** trabéculas ósseas imaturas, delimitando espaços medulares, observar os osteoblastos se incorporando ao tecido ósseo (▶) e osteócitos volumosos (→); **d)** tecido ósseo mais maduro e com arranjo lamelar, apresentando osteócitos menos volumosos (→) e osteoblastos achatados recobrimdo a superfície óssea (▶). HE. Aumento original de 100x..... 77
- FIGURA 11 - Gráfico ilustrativo das médias e DP dos dados da neoformação óssea nos diferentes grupos experimentais, aos sete e 21 dias, nos SHR machos e fêmeas ..... 85

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Resultado da contagem total de pontos (P) e valor em média porcentual do grupo C no período de sete dias, macho e fêmea.....	78
TABELA 2 -	Resultado da contagem total de pontos (P) e valor em média porcentual do grupo Am no período de sete dias, macho e fêmea.....	79
TABELA 3 -	Resultado da contagem total de pontos (P) e valor em média porcentual do grupo A1 no período de sete dias, macho e fêmea.....	79
TABELA 4 -	Resultado da contagem total de pontos (P) e valor em média porcentual do grupo A2 no período de sete dias, macho e fêmea.....	80
TABELA 5 -	Resultado da contagem total de pontos (P) e valor em média porcentual do grupo C no período de 21 dias, macho e fêmea.....	80
TABELA 6 -	Resultado da contagem total de pontos (P) e valor em média porcentual do grupo Am no período de 21 dias, macho e fêmea.....	81
TABELA 7 -	Resultado da contagem total de pontos (P) e valor em média porcentual do grupo A1 no período de 21 dias, macho e fêmea.....	81
TABELA 8 -	Resultado da contagem total de pontos (P) e valor em média porcentual do grupo C no período de 21 dias, macho e fêmea.....	82
TABELA 9 -	Estatística descritiva referente aos grupos experimentais, no período de sete dias, SHR machos.....	83

TABELA 10 -	Estatística descritiva referente aos grupos experimentais, no período sete dias, SHR fêmeas...	83
TABELA 11 -	Estatística descritiva referente aos grupos experimentais, no período 21 dias, SHR machos.....	84
TABELA 12 -	Estatística descritiva referente aos grupos experimentais, no período 21 dias, SHR fêmeas.....	84
TABELA 13 -	Análise de variância a três fatores.....	86
TABELA 14 -	Formação de grupos homogêneos após o Teste de Tukey (5%) para as variáveis grupos experimentais, períodos de observação e sexo dos animais, em relação à média de neoformação óssea.....	87



NOBRE, M.D.P. **Ação local do alendronato sódico no processo de reparação óssea de fêmures de ratos espontaneamente hipertensos (SHR)**. 2006. 116f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2006.

## RESUMO

Este trabalho analisou a ação local do alendronato sódico no processo de reparação óssea em fêmures de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Foram utilizados quarenta ratos machos e quarenta fêmeas, para a confecção de um defeito ósseo de 2,5mm de diâmetro. De acordo com o material utilizado, criaram-se quatro grupos: controle (C), amido (Am), alendronato 1mol (A1) e alendronato 2mol (A2). Os animais do grupo C não tiveram seus defeitos ósseos preenchidos. Após o período de sete e 21 dias, os animais foram sacrificados. Foi realizada a análise histológica e histomorfométrica e os dados submetidos à análise estatística ANOVA. Aos sete dias, encontrava-se tecido conjuntivo com hemorragia e infiltrado inflamatório ocupando a área do defeito em todos os grupos experimentais e, em alguns grupos, focos de matriz osteóide. Os animais dos grupos A1 e A2 apresentavam uma rede de fibrina no tecido conjuntivo. Aos 21 dias, as trabéculas ósseas fechavam praticamente toda a extensão do defeito nos grupos C e Am. No grupo A1 de animais machos, observavam-se trabéculas que se irradiavam do interior da medula óssea até a área do defeito. Nos demais grupos A1 e A2 constatava-se apenas a presença de tecido conjuntivo, com deposição de fibras colágenas e mínima deposição de matriz osteóide. Um achado histológico marcante foi a formação de tecido ósseo extra-cortical subperiosteal nos animais dos grupos A1 e A2. O estudo concluiu que, neste modelo experimental, a administração local do alendronato sódico não contribuiu para o processo de reparação óssea nas concentrações molares utilizadas.

PALAVRAS-CHAVE: Alendronato; ratos endogâmicos SHR; hipertensão; regeneração óssea.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	13
RESUMO.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 Hipertensão arterial sistêmica.....	21
2.1.1 Ratos espontaneamente hipertensos.....	27
2.2 Bisfosfonatos e o tecido ósseo.....	32
2.2.1 Alendronato sódico e a reparação tecidual.....	39
3 PROPOSIÇÃO.....	48
4 MATERIAL E MÉTODO.....	49
4.1 Animais.....	49
4.2 Divisão dos grupos.....	50
4.3 Fármaco.....	51
4.4 Procedimentos cirúrgicos.....	53
4.5 Sacrifício.....	57
4.6 Análise do defeito ósseo.....	57

4.6.1 Análise histomorfológica.....	58
4.6.2 Análise histomorfométrica.....	58
4.6.3 Análise estatística.....	59
5 RESULTADOS.....	60
5.1 Análise histomorfológica.....	60
5.1.1 Animais machos - sete dias.....	61
5.1.2 Animais fêmeas - sete dias.....	65
5.1.3 Animais machos - 21 dias .....	69
5.1.4 Animais fêmeas - 21 dias.....	73
5.2 Análise histomorfométrica.....	78
5.3 Análise estatística.....	82
6 DISCUSSÃO.....	89
7 CONCLUSÃO.....	101
8 REFERÊNCIAS.....	102
ANEXO.....	115
<i>ABSTRACT</i> .....	116

## 1 INTRODUÇÃO

O processo de reparação óssea permanece um desafio na busca da restauração anatômica e funcional do tecido perdido como resultado de doença ou trauma. Embora o osso apresente grande capacidade de regeneração, muitos defeitos ósseos cicatrizam com a formação de tecido fibroso, freqüentemente acompanhado de grandes reabsorções ósseas (LINDHE<sup>37</sup>, 2005).

Sabe-se que algumas doenças sistêmicas podem interferir diretamente no processo de reparação óssea. A hipertensão arterial sistêmica (HAS) consiste numa desordem de grande prevalência na população mundial, que pode causar alterações na densidade mineral óssea dos indivíduos.

Os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) podem ser utilizados como modelo de estudo da hipertensão arterial, uma vez que estes desenvolvem a doença de forma similar àquela encontrada em humanos, com as mesmas alterações no metabolismo do cálcio, como a hipercalciúria, aumento dos níveis de paratormônio (PTH) e perda de cálcio ósseo (IZAWA et al.<sup>28</sup>, 1985; INOUE et al.<sup>26</sup>, 1995).

Em 2004, Pereira<sup>51</sup> realizou um estudo que relacionou a hipertensão ao processo de reparação óssea em ratos tipo SHR. Seu estudo mostrou que a reparação óssea em fêmures de SHR, após sete e 21 dias, apresentava-se mais avançada quando comparada com aquela observada nos animais normotensos.

O alendronato sódico é um bisfosfonato amplamente empregado no tratamento de doenças caracterizadas pela reabsorção óssea, como a osteoporose, doença de Paget, osteólise induzida por

tumores e hipercalcemia maligna (FLEISCH<sup>19</sup>, 1997; REINHOLZ et al.<sup>56</sup>, 2000; ALENCAR et al.<sup>1</sup>, 2002). Na Odontologia, tem se estudado sua aplicação na prevenção de reabsorções ósseas após cirurgias de retalho total, como coadjuvante no tratamento da doença periodontal e associado a implantes dentários (YAFFE et al.<sup>81</sup>, 1997; MERAW et al.<sup>42</sup>, 1999; ROCHA et al.<sup>57</sup>, 2001; TAKAISHI et al.<sup>67</sup>, 2001; TENENBAUM et al.<sup>69</sup>, 2002). No entanto, pouco se conhece a respeito de sua administração local como material de preenchimento ósseo (FERNANDES<sup>17</sup>, 2005; JAIME et al.<sup>29</sup>, 2005).

O alendronato sódico é um fármaco que tem a capacidade de se ligar fortemente aos cristais de hidroxiapatita do osso, principalmente nas áreas de remodelação óssea ativa (KULAK & BILEZIKIAN<sup>35</sup>, 2000; TENENBAUM et al.<sup>69</sup>, 2002). Apesar de seu mecanismo de ação ainda não estar bem esclarecido, sabe-se que o alendronato age diminuindo a reabsorção óssea através da inibição direta dos osteoclastos, além de estimular os osteoblastos a produzirem um fator inibidor de recrutamento dos osteoclastos, contribuindo para um aumento da densidade mineral óssea (REDDY et al.<sup>55</sup>, 1995; FLEISCH<sup>19</sup>, 1997; FISHER et al.<sup>18</sup>, 1999).

Estudos recentes realizados *in vitro* demonstram que, além de inibir a reabsorção óssea, o alendronato sódico também atua estimulando a proliferação e a maturação dos osteoblastos, o que sugere uma ação relevante na formação óssea (REINHOLZ et al.<sup>56</sup>, 2000; IM et al.<sup>25</sup>, 2004).

A ação do alendronato sódico na reparação óssea tem sido avaliada por vários trabalhos (MERAW et al.<sup>42</sup>, 1999; SILVA<sup>64</sup>, 2000; FAYAD<sup>14</sup>, 2001; FERNANDES<sup>16</sup>, 2002). No entanto, os resultados ainda são conflitantes e a maioria dos estudos demonstra que a administração do medicamento de forma sistêmica não interfere no processo de reparação óssea (SILVA<sup>64</sup>, 2000; FERNANDES<sup>16</sup>, 2002).

A ação sistêmica dos bisfosfonatos é limitada nesses casos, pois apresentam baixa absorção no trato gastrointestinal e no plasma sanguíneo desaparecem rapidamente, depositando-se no osso de forma não homogênea (LIN<sup>36</sup>, 1996). De acordo com a literatura, a ação local desses medicamentos parece ser mais efetiva (MERAW et al.<sup>42</sup>, 1999; YAFFE et al.<sup>82</sup>, 2000; SHIBATA et al.<sup>63</sup>, 2004), no entanto, ainda não se identificou a melhor forma de biodisponibilizar o fármaco localmente para que haja uma ação positiva no reparo ósseo (FERNANDES<sup>17</sup>, 2005; JAIME et al.<sup>29</sup>, 2005). Alguns autores sugerem que esse medicamento apresenta uma resposta bifásica e que diferentes concentrações podem resultar em efeitos distintos.

De acordo com o que foi relatado, acreditamos ser pertinente estudar, neste modelo experimental, a ação local do alendronato sódico no processo de reparo do tecido ósseo de ratos hipertensos (SHR).

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Hipertensão arterial sistêmica**

As doenças do aparelho circulatório constituem a principal causa de morte no Brasil, em ambos os sexos, com tendência claramente ascendente na mortalidade proporcional a partir da quarta década de vida (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE<sup>48</sup>, 2002). Neste quadro, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) se destaca como fator de risco.

A HAS é considerada uma condição crônica, com efeitos prolongados, que se caracteriza pela pressão sangüínea com valor igual ou acima de 140/90mmHg, em pelo menos duas aferições realizadas no mesmo momento (BRASIL<sup>6</sup>, 2001). No entanto, o conceito real da HAS compreende um contexto sindrômico, englobando várias alterações hemodinâmicas, tróficas e metabólicas importantes (NOBRE & LIMA<sup>47</sup>, 2000).

Estima-se que a hipertensão, em todo o mundo, atinja em torno de um bilhão de indivíduos e aproximadamente 7,1 milhões de mortes por ano podem ser atribuídas a esta doença (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH<sup>44</sup>, 2004).

Considerando os níveis da pressão arterial (PA) maior que 140/90mmHg como indicadores de hipertensão, levantamentos populacionais realizados em algumas cidades brasileiras demonstraram que as taxas de prevalência da doença na população urbana adulta têm variado entre 22,3% a 43,9%. Essa prevalência aumenta, sobretudo, entre as mulheres, os negros e os idosos. Constatou-se que mais de 50%

dos indivíduos entre sessenta e 69 anos e aproximadamente três quartos da população acima dos setenta anos são afetados (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO<sup>62</sup>, 2002).

A HAS representa uma causa importante de mortalidade cardiovascular, pois tem como conseqüências a doença cerebrovascular, a doença arterial coronária, insuficiência renal crônica e doença vascular de extremidades. Dados do Ministério da Saúde demonstram que, no Brasil, a hipertensão causa 40% das mortes por acidente vascular cerebral e 25% daquelas por doença coronária (BRASIL<sup>6</sup>, 2001).

Embora ainda não seja totalmente conhecido, o desenvolvimento da HAS depende da interação entre predisposição genética e fatores ambientais. Sabe-se, no entanto, que a hipertensão é acompanhada por alterações funcionais renais, do sistema nervoso simpático (SNS), do sistema renina-angiotensina (SRA), além de alterações em outros mecanismos humorais e de disfunção endotelial. Assim a hipertensão resulta de várias alterações estruturais do sistema cardiovascular que tanto amplificam o estímulo hipertensivo, quanto causam dano cardiovascular (WORLD HEALTH ORGANIZATION<sup>77</sup>, 2003).

O SRA está envolvido no controle fisiológico da pressão arterial e no controle do sódio. Tem importantes implicações no desenvolvimento da hipertensão renal e parece estar envolvido na patogênese da hipertensão arterial essencial (DOUGLAS<sup>13</sup>, 2002).

Tortora & Grabowski<sup>70</sup> (2002) citaram que a ativação deste sistema ocorre quando as células renais liberam quantidade aumentada da enzima renina na corrente sangüínea, a qual junto com a enzima conversora da angiotensina (ECA), atua sobre seus substratos produzindo o hormônio ativo angiotensina II (Ang II), largamente conhecido como um potente agente vasoconstritor.



A Ang II é um octapeptídeo que exerce papel importante na manutenção do volume de fluido extracelular e da pressão sangüínea. No entanto, sua função não está somente limitada à ação direta sobre o músculo liso dos vasos sanguíneos. A Ang II aumenta a atividade do sistema nervoso simpático (WOLF & WENZEL<sup>78</sup>, 2004) e estimula a liberação das catecolaminas pela glândula adrenal, amplificando a resposta cardiovascular. Também regula a concentração de sódio e o volume sanguíneo através da secreção de aldosterona pelo córtex da adrenal e de hormônio pituitário antidiurético (PACKER<sup>50</sup>, 2006).

Além do seu papel bem elucidado na homeostase circulatória, é relatada a ação da Ang II numa variedade de processos, como nas respostas imune e inflamatória, estimulando a ação das citocinas no desenvolvimento embrionário, nos processos de injúria e reparação tecidual no adulto (PACKER<sup>50</sup>, 2006). Influi ainda no aumento da susceptibilidade à trombose, nos processos de fibrose, na remodelação dos tecidos, na modulação do crescimento celular e estimulando a produção de outros fatores hormonais (BURNIER & BRUNNER<sup>9</sup>, 2000).

Dependendo do tipo celular, do subtipo de receptores para Ang II e da presença de outros fatores de crescimento e citocinas, a Ang II pode estimular o crescimento celular por meio da proliferação ou hipertrofia, ou, alternativamente, agir como supressora desse crescimento, através da apoptose ou induzindo a diferenciação celular (WOLF & WENZEL<sup>78</sup>, 2004).

Apesar da etiologia da hipertensão primária ainda ser desconhecida, existem indicadores de que ela tenha sua patogenia semelhante em humanos e em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), estando associada a alterações no metabolismo do cálcio (IZAWA et al.<sup>28</sup>, 1985; BARBAGALLO et al.<sup>3</sup>, 1991; OSHIMA & YOUNG<sup>49</sup>, 1995).

Nos humanos, níveis reduzidos de íons cálcio sérico, níveis aumentados de cálcio e AMP cíclico na urina e níveis séricos aumentados de 1,25-diidroxicolecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>) e de paratormônio (PTH) têm sido associados com a hipertensão (McCARRON et al.<sup>41</sup>, 1981; BRICKMAN et al.<sup>7</sup> 1990; JORDE et al.<sup>32</sup>, 2000). Tais alterações no metabolismo do cálcio podem determinar o índice de massa óssea nesse grupo de pacientes.

Nos quadros de HAS, os baixos níveis de íons cálcio no soro, principalmente devido à presença de hipercalcúria, podem estimular um aumento compensatório na produção do PTH. Este é o principal hormônio relacionado com o controle do nível plasmático de cálcio no organismo, ou seja, quando o nível de cálcio sérico encontra-se abaixo do normal, as paratireóides aumentam a secreção do hormônio. Desta forma, níveis elevados de PTH tendem a contribuir para o processo de remodelação óssea, pois estimulam a atividade osteoclástica e mobilizam o cálcio presente no esqueleto, podendo levar a uma diminuição da densidade mineral óssea (JESPERSEN<sup>30</sup>, 1997). Além da sua ação sobre o tecido ósseo, o PTH também estimula a absorção intestinal do cálcio e reduz sua excreção renal.

Alguns estudos têm demonstrado a relação entre os níveis séricos do PTH e a pressão sanguínea (PS) dos indivíduos. Além disso, experimentos *in vitro* e *in vivo* comprovam o efeito anabólico do hormônio sobre o metabolismo ósseo.

Brickman et al.<sup>7</sup> (1990) observaram que os indivíduos com hipertensão essencial apresentavam níveis significativamente maiores de cálcio intracelular, de PTH e de vitamina D<sub>3</sub>, além de uma menor quantidade de cálcio sérico.

Uzawa et al.<sup>74</sup> (1995) compararam os efeitos do PTH humano sintético (hPTH(1,32)) sobre o tecido ósseo de ratos, quando administrado por injeção intermitente ou contínua, durante quatro semanas. Os resultados demonstraram que o tratamento com infusão

contínua de hPTH(1,32) tanto acelerou a formação óssea quanto a sua reabsorção havendo, portanto, maior remodelação do tecido. Já sob o tratamento com infusão intermitente do hormônio, houve uma predominância da aposição óssea sobre a reabsorção.

Ishizuya et al.<sup>27</sup> (1997) realizou estudo *in vitro*, tratando células osteoblásticas isoladas de calvária de ratos recém-nascidos com PTH e concluíram que o hormônio tem diversos efeitos, dependendo da forma de administração. Observaram que a exposição contínua ao PTH resultou na inibição da diferenciação osteoblástica, enquanto a exposição intermitente levou a um efeito anabólico sobre a diferenciação das células.

Jilka et al.<sup>31</sup> (1999) observou que a infusão diária de PTH em ratos resultou em maior formação óssea, sem influenciar na formação e diferenciação de novos osteoblastos, mas aumentando sua meia-vida através da inibição do processo de apoptose.

Em 2000, Jorde et al.<sup>32</sup> observaram que os pacientes que ingeriam pouco cálcio na dieta apresentavam níveis séricos aumentados de PTH, com redução moderada do conteúdo mineral ósseo e da densidade mineral óssea (DMO) da coluna vertebral lombar. Nas mulheres, o aumento do PTH sérico também esteve associado à presença de pressão sanguínea marcadamente elevada.

A relação entre os níveis de PS e a DMO dos indivíduos foi estudada por alguns autores (CAPPuccio et al.<sup>10</sup>, 1999; TSUDA et al.<sup>72</sup>, 2001; MUSSOLINO et al.<sup>43</sup>, 2003; NICHOLS et al.<sup>46</sup>, 2003; PÉREZ-CASTRILLÓN et al.<sup>52</sup>, 2003).

Cappuccio et al.<sup>10</sup> (1999) estudaram a relação entre a PS e a perda óssea mineral em mulheres brancas idosas, ao longo do tempo. Em um primeiro momento, os autores avaliaram a PS e a densidade mineral óssea (DMO) do colo do fêmur e, após 3,5 anos, repetiram a densitometria óssea por meio do sistema de dupla emissão de raios X (DXA). Os autores concluíram que a PS elevada em mulheres brancas

idosas está associada com o aumento da perda óssea no colo do fêmur, o que pode contribuir para o risco de fraturas.

Estudo comparativo da DMO da coluna lombar de mulheres japonesas foi realizado por Tsuda et al.<sup>72</sup> (2001). O estudo verificou que as mulheres hipertensas apresentavam uma maior proporção de cálcio/sódio presente na urina, quando comparadas às mulheres normotensas. Os autores observaram que quanto mais alta essa proporção, mais baixa a DMO, sugerindo que a HAS pode estar associada com a diminuição da DMO.

Pérez-Castrillón et al.<sup>52</sup> (2003) avaliaram a massa óssea de mulheres hipertensas, pós-menopausa, e a influência da hipertensão sobre a homeostase do cálcio e os marcadores de remodelação óssea. Observaram que as mulheres hipertensas e osteoporóticas apresentaram índices de massa corporal, calciúria e razão cálcio/creatinina significativamente maiores, quando comparadas àquelas mulheres hipertensas que não apresentavam osteoporose. Apesar dos níveis de osteocalcina estarem diminuídos nas mulheres hipertensas, não foi encontrada relação direta entre as pressões arteriais sistólica e diastólica com os índices de massa óssea. Nas normotensas, notaram que apenas a calciúria foi menor. Os autores acreditam que o aumento da remodelação óssea provavelmente esteja ligado à hipercalciúria, desordem freqüente nos indivíduos hipertensos, estando associada com a diminuição da DMO, apesar de outros fatores poderem estar envolvidos.

A relação entre a DMO e o polimorfismo genético da ECA foi estudada por Pérez-Castrillón et al.<sup>53</sup> (2003) em mulheres hipertensas pós-menopausa. Nos casos de deleção e inserção nos genes da ECA, houve uma redução da DMO, verificando que é possível a existência de uma relação do SRA com os processos de remodelação do tecido ósseo.

Mussolino et al.<sup>43</sup> (2003) realizaram um estudo longitudinal, relacionando a DMO com a incidência e mortalidade por acidente vascular cerebral (AVC). Os autores utilizaram dados

epidemiológicos para relacionar a DMO das falanges da mão esquerda com a incidência de AVC, no período de vinte anos. A amostra incluiu um número de 3402 indivíduos, brancos e negros, com faixa etária entre 45 a 74 anos de idade. Os resultados demonstraram que não houve associação significativa da DMO com o desenvolvimento de AVC nos indivíduos em ambas as raças, com o passar do tempo.

Segundo Nichols et al.<sup>46</sup> (2003), em homens e mulheres hipertensos, a associação entre PS e DMO pode ser resultado da menor frequência na realização de atividade física observada nos indivíduos com pressão arterial elevada.

Todo esse quadro sinaliza que a hipertensão arterial sistêmica pode provocar alterações ósseas importantes, podendo interferir nos processos de reparo ósseo.

### **2.1.1 Ratos espontaneamente hipertensos (SHR)**

Os ratos tipo SHR consistem num modelo experimental de estudo da hipertensão amplamente utilizado em pesquisa médica, pois desenvolvem a doença com características similares a do homem (McCARRON et al.<sup>41</sup>, 1981; BARBAGALLO et al.<sup>3</sup>, 1991; WANG et al.<sup>75</sup>, 1993; INOUE et al.<sup>26</sup>, 1995; WRIGHT & DeMOSS<sup>79</sup>, 2000; TRIANTAFYLLIDI et al.<sup>71</sup>, 2004). Estes animais desenvolvem geneticamente a hipertensão primária, sendo esta observada em 90% dos casos encontrados em humanos hipertensos (UDENFRIEND et al.<sup>73</sup>, 1976).

Os SHR foram criados no centro de animais *Wistar* na Universidade de Kyoto em 1966, por Okamoto e Aoki, os quais examinaram a PS de centenas de ratos e escolheram o macho e a fêmea que apresentavam os maiores valores. Após o cruzamento sucessivo dos

ratos, nasceram animais que apresentaram, uniformemente, um valor de PS maior que 180mmHg, quando com vinte semanas de idade. Dessa forma, alcançaram 100% de hipertensão na população dos SHR (UDENFRIEND et al.<sup>73</sup>, 1976). Contudo a etiologia da doença nesses animais continua incerta.

Várias diferenças relacionadas à pressão arterial têm sido relatadas entre os SHR e os ratos normotensos *Wistar Kyoto*. Uma diferença importante está na atividade do SNS, a qual parece estar mais elevada nos SHR. Estes animais apresentam disfunção no mecanismo adrenérgico central, originando um aumento na liberação de noradrenalina e subsequente hipertensão (GAVRAS et al.<sup>22</sup>, 2001; TRIANTAFYLLIDI et al.<sup>71</sup>, 2004).

Os receptores adrenérgicos do SNS são divididos em duas grandes categorias,  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , sendo que cada um deles se divide em subgrupos. O estímulo dos receptores do subgrupo  $\alpha_{2A}$  leva à supressão do SNS e provoca hipotensão. Já os receptores do subgrupo  $\alpha_{2B}$ , quando ativados, estimulam o SNS provocando uma resposta hipertensiva (TRIANAFYLLIDI et al.<sup>71</sup>, 2004).

Triantafyllidi et al.<sup>71</sup> (2004) revelaram que o desenvolvimento da hipertensão nos ratos tipo SHR não parece estar apenas relacionado com a variação genética dos receptores adrenérgicos  $\alpha_{2B}$ , uma vez que os resultados da análise do genoma desses animais foram idênticos quando comparados aos dos ratos normotensos. Os autores sugerem que a hipertensão arterial nos SHR pode ser decorrente de alterações funcionais que atuam num estágio tardio de transcrição do DNA, no citoplasma ou na membrana celular, ou mesmo devido à presença de diferenças quantitativas na proporção de subtipos de receptores em vários sítios do cérebro.

Além de apresentarem a hipertensão arterial semelhante a dos humanos, está comprovado que os SHR também apresentam alterações no metabolismo do cálcio devido à elevada PS que podem

interferir na composição do esqueleto ósseo desses animais. Por exemplo, baixa absorção duodenal de cálcio, e DMO e conteúdo de cálcio ósseo reduzidos são características que têm sido evidenciadas nos SHR quando comparados com os ratos normotensos (McCARRON et al.<sup>41</sup>, 1981; LUCAS et al.<sup>39</sup>, 1986; WRIGHT & DeMOSS<sup>79</sup>, 2000).

Estudos realizados em ratos tipo SHR demonstram que, com o passar do tempo, a hipercalciúria e a ativação secundária das glândulas paratireóides levam a um menor crescimento do tecido ósseo e a uma diminuição da massa mineral óssea total (McCARRON et al.<sup>41</sup>, 1981; IZAWA et al.<sup>28</sup>, 1985), culminando em desordens ósseas.

Izawa et al.<sup>28</sup> (1985) realizaram um estudo comparativo do tecido ósseo de ratos machos SHR e *Wistar Kyoto* (WKY) normotensos, através de análise bioquímica e histológica. Os resultados demonstraram níveis do cálcio sérico semelhantes nos dois grupos, apesar dos níveis de fósforo sérico terem sido significativamente menores nos hipertensos. Os autores também observaram que os SHR apresentavam fêmures mais curtos, bem como uma redução da espessura cortical, do crescimento ósseo longitudinal e da porcentagem de área cortical da tíbia.

Barbagallo et al.<sup>3</sup> (1991) relataram que além da diminuição da densidade óssea, os SHR também apresentam alterações no mecanismo de remodelação óssea e sugeriram que estes animais são osteopênicos. Os autores compararam ratos SHR e WKY machos, avaliando a histomorfometria da porção proximal da tíbia, a densidade mineral dos fêmures pela DXA e as medidas do conteúdo cálcico do fêmur. A DMO e o conteúdo de cálcio ósseo foram maiores nos animais normotensos, enquanto nenhuma diferença significativa foi encontrada nos valores do fósforo. Os autores evidenciaram ainda, que os ratos hipertensos apresentaram maiores taxas de reabsorção e de neoformação óssea, com aumento significativo na área da superfície de reabsorção, na área da superfície do tecido osteóide e no volume do tecido osteóide.

Yamori et al.<sup>83</sup> (1991) realizaram um estudo comparativo para avaliar o conteúdo cálcico e a DMO do fêmur, tibia e primeira vértebra lombar de dez ratos SHR e dez ratos WKY. As análises sorológicas indicaram que pode existir uma ativação do PTH nos animais tipo SHR, em que, tanto as concentrações de cálcio ionizado e total estavam elevadas. Uma diminuição do osso trabecular foi evidenciada nesses animais, como resultado dos estudos de microradiografia e histomorfometria óssea, além de mostrar-se mais frágil em resposta aos testes mecânicos de torção e resistência. Os autores sugerem que esses animais desempenham papel importante como modelo animal para o estudo do desenvolvimento da osteoporose.

A presença de osso medular deficiente no esqueleto dos SHR, com uma atividade osteoclástica mais proeminente que a osteoblástica foi evidenciada por Wang et al.<sup>75</sup> (1993). Os autores estudaram as mudanças histomorfométricas da porção proximal da tibia de ratos tipo SHR e ratos normotensos WKY, com 26 semanas e observaram que os SHR apresentaram menores valores do peso corporal, com uma diminuição do volume do osso trabecular, menor número e espessura das trabéculas ósseas, menor quantidade de osteoblastos e células osteoprogenitoras. Já o número de osteoclastos, núcleo de osteoclastos por milímetro e razão osteoclastos/osteoblastos estavam significativamente aumentados. Concluíram que a diminuição do volume trabecular pode estar associada principalmente aos níveis elevados do PTH, bem como aos níveis reduzidos de vitamina D<sub>3</sub>, baixa absorção de cálcio, baixo peso corporal, diminuindo as cargas mecânicas sobre o tecido, entre outros fatores ainda a serem elucidados.

Inoue et al.<sup>26</sup> (1995) estudaram ratos normotensos do tipo *Sprague-Dawley* (SD) e SHR de ambos os sexos, e observaram que o peso corpóreo do rato, comprimento, volume e peso seco da tibia apresentaram maiores valores nos SD machos e menores nas SHR fêmeas. Ao avaliarem parâmetros bioquímicos séricos, entre eles: cálcio



ionizado, cálcio total, PTH, fosfatase alcalina óssea (FAO) e fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP), os autores constataram que os valores foram semelhantes e que todos mostraram a mesma tendência em ambos os sexos dos dois grupos, exceto a FAO que, em ambos os grupos, apresentou nível sérico com maiores valores nos machos que nas fêmeas. Na análise morfométrica, os autores notaram que a taxa de aposição mineral, volume do osso trabecular e espessura trabecular foram semelhantes entre os mesmos sexos de ambos os grupos. Quanto à DMO, na área proximal da tíbia, os autores verificaram que ambos os sexos dos SHR apresentaram menores valores quando comparados aos SD. Estes achados sugerem que o osso trabecular dos SHR apresenta menor condição mineral do que nos ratos normotensos.

Estudo realizado por Wright & DeMoss<sup>79</sup> (2000) comparou a reabsorção óssea do esqueleto de ratos machos e fêmeas SHR, WKY e SD. Nos animais com oito semanas de idade, a taxa de reabsorção nos SHR de ambos os sexos foi significativamente maior que a encontrada nos normotensos, apesar dessa tendência mostrar-se reduzida nas fêmeas quando comparadas aos machos. Grande diferença entre os sexos foi observada na 24<sup>a</sup> semana, com uma elevada taxa de reabsorção nas fêmeas hipertensas. Os autores puderam observar uma alteração no processo de remodelação óssea, notando que a atividade de reabsorção foi significativamente maior nos SHR, quando comparada com controles normotensos, principalmente nas fêmeas.

Apesar de vários estudos comprovarem a ação da HAS nos mecanismos de remodelação óssea, até então nenhum trabalho havia verificado o processo de reparação óssea em ratos hipertensos.

Em 2004, Pereira<sup>51</sup> realizou um estudo comparando o processo de reparação óssea em ratos normotensos WKY e ratos tipo SHR. Foi realizado um defeito ósseo no fêmur esquerdo dos animais de ambos os sexos e, após sete e 21 dias, os mesmos foram sacrificados. Foram então realizadas as análises histológica e histomorfométrica da

área do defeito ósseo. Os resultados demonstraram que os animais hipertensos apresentaram uma reparação óssea mais avançada quando comparados aos normotensos, sendo a reparação maior no período de 21 dias em todos os animais, sem diferença entre os sexos.

Desde modo, há indicação suficiente para utilizar ratos SHR como um modelo para a investigação do reparo ósseo, já que os mesmos apresentam inúmeras alterações estruturais e metabólicas devido à doença hipertensiva, com grande semelhança ao que ocorre nos humanos.

## **2.2 Bisfosfonatos e o tecido ósseo**

O osso é um tecido conjuntivo especializado composto por fases minerais e orgânicas, perfeitamente organizado para desempenhar suas funções. Ele é formado por uma combinação de osso compacto denso e osso esponjoso (trabecular). O osso compacto contém, em média, cerca de 30% de matriz orgânica e 70% de sais. (DOUGLAS<sup>13</sup>, 2002). Contudo, o osso recém-formado pode conter uma porcentagem consideravelmente maior de matriz em relação aos sais.

A matriz orgânica do osso é constituída de 90 a 95% de fibras colágenas tipo I, sendo o restante de substância fundamental e proteínas não-colagenosas. As fibras colágenas estendem-se principalmente em torno das linhas de força tensional, proporcionando ao osso sua força elástica. Além do colágeno, encontramos também as proteínas não-colagenosas, tais como osteonectina, osteocalcina, proteína morfogenética óssea e sialoproteína óssea. A substância fundamental é composta de líquido extracelular, glicoproteínas e proteoglicanos, principalmente o sulfato de condroitina e ácido hialurônico. A matriz orgânica, quando o osso se apresenta

descalcificado, cora-se com os corantes específicos do colágeno (TENCATE<sup>68</sup>, 2001; JUNQUEIRA & CARNEIRO<sup>33</sup>, 2004).

O tecido ósseo é distinguido dos outros tecidos pela presença de fosfato e cálcio mineral ao longo das fibras colágenas, como a hidroxiapatita [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ ], que incorpora em sua estrutura outros íons e sais, sendo o principal componente mineral constituinte do osso e o elemento essencial responsável pela função de apoio mecânico (DOUGLAS<sup>13</sup>, 2002).

Devido à sua dinâmica, o tecido ósseo está constantemente sofrendo remodelação, um processo complexo que envolve a reabsorção do osso numa superfície em particular, seguida por uma fase de formação óssea. Em adultos normais, há um equilíbrio entre a quantidade de osso reabsorvido pelos osteoclastos e a quantidade de osso formado pelos osteoblastos (FROST<sup>20</sup>, 1964). No entanto, algumas doenças como a osteoporose, doença de Paget e hipercalcemia da malignidade são caracterizadas pela prevalência da reabsorção óssea.

Os bisfosfonatos são compostos químicos conhecidos pela sua afinidade pela hidroxiapatita e constituem uma classe única de drogas caracterizadas farmacologicamente por sua capacidade de inibir a reabsorção óssea (LIN<sup>36</sup>, 1996).

São considerados análogos sintéticos da substância endógena denominada pirofosfato (P-O-P), o qual se encontra naturalmente presente no soro e na urina, atuando como um regulador fisiológico da calcificação e da reabsorção óssea. A ação dos bisfosfonatos deve-se à semelhança estrutural com esse grupo de compostos. No entanto, a sua estrutura se caracteriza pela ligação P-C-P, contendo o átomo de carbono substituindo o átomo central de oxigênio. Esta modificação torna os bisfosfonatos mais resistentes à degradação enzimática no organismo, com uma meia-vida biológica maior suficiente para influenciar o metabolismo ósseo (FLEISCH<sup>19</sup>, 1997; CASTRO et al.<sup>11</sup>, 2004).

A possibilidade de configurações variadas da molécula dos bisfosfonatos, através de alterações nas suas cadeias laterais, oferece uma grande adaptabilidade química a esses compostos, resultando em diferenças farmacológicas importantes (KULAK & BILEZIKIAN<sup>35</sup>, 2000).

Para Geddes et al.<sup>24</sup> (1994) os bisfosfonatos se caracterizam pela presença de dois grupos fosfonatos ligados a um átomo de carbono geminal único (P-C-P), que possui duas cadeias laterais com estruturas variáveis R1 e R2. Os dois grupos fosfonatos e a cadeia lateral R1 são os principais determinantes da afinidade pelo mineral ósseo, com um grupo hidroxila ressaltando essa característica, que pode variar de um composto para outro. A cadeia R2 determina a potência anti-reabsortiva, com os grupos amino ou pirinidil, contendo nitrogênio.

Já na metade do século XIX, um dos primeiros bisfosfonatos a ser sintetizado foi o ácido etano-1-hidroxi-1,1-bisfosfônico (etidronato), cujo principal objetivo era ser utilizado como aditivo para detergentes (BIOMEN<sup>5</sup>, 1995). Mas logo foram observados seus efeitos fisiológicos, como a capacidade de inibir a reabsorção óssea (LOVDAHL & PIETRZYK<sup>38</sup>, 1999). A partir desta observação, iniciaram-se pesquisas para a síntese de diversos outros bisfosfonatos e para a avaliação de seus efeitos fisiológicos.

De acordo com sua composição química e potência, os bisfosfonatos podem ser agrupados em fármacos de primeira, segunda e terceira geração. Os bisfosfonatos que contêm um átomo de nitrogênio primário em uma cadeia alquílica (pamidronato e alendronato) podem ser 10 a 100 vezes mais potentes que o etidronato e o clodronato. Entre os mais potentes estão aqueles contendo o átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico (risedronato, ibandronato e zoledronato) (GEDDES et al.<sup>24</sup>, 1994; RUSSEL et al.<sup>60</sup>, 1999).

Os bisfosfonatos são fármacos que apresentam baixa absorção intestinal em humanos, com biodisponibilidade de cerca de 0,7% para o alendronato, 0,3% para o pamidronato, 3 a 7% para etidronato e 1 a 2% para clodronato (LIN<sup>36</sup>, 1996). Sua baixa absorção ocorre devido à sua baixa lipofilicidade, o que dificulta o transporte através do epitélio. Além do mais, são moléculas relativamente grandes, negativamente carregadas no pH intestinal, formando complexos com o cálcio, o que dificulta sua absorção (KULAK & BILEZIKIAN<sup>35</sup>, 2000).

A excreção renal é a única forma de eliminação dos bisfosfonatos. Após a administração intravenosa, desaparecem do plasma rapidamente, com uma meia-vida de uma a duas horas. Por outro lado, quando incorporada ao osso, a droga só é liberada quando este sofre reabsorção. Os bisfosfonatos ligam-se preferencialmente ao tecido ósseo que apresenta altas taxas de remodelação, devido à grande exposição da hidroxiapatita nesses sítios (LIN<sup>36</sup>, 1996).

Os bisfosfonatos apresentam poucos efeitos adversos. O etidronato pode causar inibição da mineralização normal dos ossos, originando fraturas (FERNANDES<sup>15</sup>, 2005). Alguns bisfosfonatos podem, ainda, provocar efeitos inflamatórios indesejáveis, como febre em 10 a 50% dos pacientes, bem como estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF- $\alpha$ ) em humanos e em animais (SUGAWARA et al.<sup>65</sup>, 1998; YAMAGUCHI et al.<sup>80</sup>, 2000). Quando administrados por via oral, podem provocar distúrbios gastrintestinais.

A sua utilização clínica tornou-se uma alternativa para o tratamento de uma variedade de patologias caracterizadas pela reabsorção óssea, como a doença de Paget, hipercalcemia associada à malignidade e na prevenção e no tratamento da osteoporose (FLEISCH<sup>19</sup>, 1997; KULAK & BILEZIKIAN<sup>35</sup>, 2000). Também têm sido empregados nos procedimentos cirúrgicos odontológicos e no tratamento da doença periodontal, com o objetivo de diminuir as perdas de tecido ósseo (MERAW et al.<sup>42</sup>, 1999; TENENBAUM et al.<sup>69</sup>, 2002).

O tratamento com os bisfosfonatos leva a um aumento da densidade mineral do tecido ósseo, que tem sido atribuído a uma diminuição da remodelação óssea. No entanto, seus verdadeiros mecanismos de ação são ainda pouco conhecidos (WEINREB et al.<sup>76</sup>, 1994; LIN<sup>36</sup>, 1996; ALENCAR et al.<sup>1</sup>, 2002).

Todos os bisfosfonatos se ligam ao osso através da sua estrutura P-C-P, que colabora para a incorporação rápida ao tecido e para sua ação seletiva no esqueleto. Inicialmente, acreditava-se que após a adsorção óssea, apenas um mecanismo físico-químico fosse suficiente para sua ação. Devido à grande afinidade pelos cristais de cálcio, há a formação de complexos com a hidroxiapatita do osso, acarretando em modificações na sua estrutura cristalina e inibindo seu crescimento, agregação e dissolução (RODAN & FLEISH<sup>58</sup>, 1997; CASTRO et al.<sup>11</sup>, 2004). Nos últimos quinze anos se tornou importante o estudo dos fenômenos celulares que também estão envolvidos no mecanismo de ação desses fármacos.

Sabe-se que a inibição da reabsorção óssea proporcionada pelos bisfosfonatos é mediada por uma ação direta sobre os osteoclastos. O fármaco presente nas lacunas de reabsorção é assimilado por essas células, podendo afetar o seu metabolismo intracelular e induzir a apoptose (SATO et al.<sup>61</sup>, 1991; ROGERS et al.<sup>59</sup>, 1999; NEVES et al.<sup>45</sup>, 2002).

Evidências sugerem que os bisfosfonatos inibem a reabsorção óssea por meio de alterações nas bordas “em escova” dos osteoclastos e por meio do aumento de sua permeabilidade ao cálcio e a outros íons, afetando a atividade celular e sua sobrevivência (SATO et al.<sup>61</sup>, 1991). Através de uma ação indireta, os bisfosfonatos também inibem a diferenciação e o recrutamento dos osteoclastos para a superfície óssea. Essa ação é, em parte, mediada pelos osteoblastos, que passam a produzir um fator inibidor de recrutamento dos osteoclastos (FLEISCH<sup>19</sup>, 1997).

Outros estudos sugerem, ainda, a ação dos bisfosfonatos sobre a proliferação dos osteoblastos, com importante ação na formação óssea (GIULIANI et al.<sup>23</sup>, 1998; REINHOLZ et al.<sup>56</sup>, 2000; IM et al.<sup>25</sup>, 2004). Segundo os autores, os efeitos observados até então, parecem depender da droga, concentração empregada e forma de administração.

García-Moreno et al.<sup>21</sup> (1998) analisaram o efeito direto do alendronato, nas concentrações de  $10^{-1}$  a  $10^{-12}$  mol/L, sobre a viabilidade celular, a síntese de colágeno e a capacidade de mineralização de osteoblastos normais humanos em cultura. As concentrações entre  $10^{-5}$  e  $10^{-12}$  mol/L não exerceram efeito na capacidade proliferativa celular, no entanto, em concentração igual ou maior que  $10^{-4}$  mol/L, a viabilidade das células osteoblásticas foi afetada. A síntese de colágeno diminuiu após a incubação com alendronato, mas nenhum efeito da droga foi observado sobre o depósito de cálcio por osteoblastos na concentração igual ou menor que  $10^{-5}$  mol/L.

Giuliani et al.<sup>23</sup> (1998) realizaram estudo *in vitro*, investigando a ação do etidronato e do alendronato sobre cultura de células da medula óssea de ratos e de humanos, mensurando a quantidade de unidade formadora de colônias para fibroblastos (CFU-F) e de unidade formadora de colônias para osteoblastos (CFU-OB). Os resultados demonstraram que nas culturas de medula óssea de ratos, o etidronato estimulou, significativamente, a formação de CFU-F, com efeito máximo numa concentração de  $10^{-5}$  mol/L, enquanto o alendronato apresentou um efeito bifásico, estimulando quando a concentrações menores que  $10^{-7}$  mol/L e sendo inibidor em concentrações maiores. A formação de CFU-OB na medula óssea de ratos também foi inibida por ambas as drogas nas suas maiores concentrações, mas foi significativamente estimulada quando estas foram mais baixas. No caso das culturas de células de medula óssea humana, o alendronato aumentou a formação de CFU-F e de CFU-OB, havendo o efeito máximo do fármaco na concentração de  $10^{-10}$  mol/L.

A partir do estudo *in vivo* realizado em ratas, Giuliani et al.<sup>23</sup> (1998) observaram a ação dos bisfosfonatos na formação de precursores dos osteoblastos na cultura de células da medula óssea desses animais. Um primeiro grupo de ratas jovens recebeu, semanalmente, injeções subcutâneas de etidronato (0,3mg/kg, 3mg/kg, e 30mg/kg) ou alendronato (0,3µg/kg, 3µg/kg, e 30µg/kg). O segundo grupo era composto de ratas mais velhas, que receberam injeções de ambos os bisfosfonatos, nas suas dosagens mais baixas. Após um mês de experimento, o etidronato (0,3 mg/kg e 3mg/kg) e o alendronato (0,3µg/kg e 3µg/kg) causaram um aumento significativo no número de CFU-F na cultura de células da medula óssea de ambos os grupos de animais. Os autores sugerem que os bisfosfonatos podem ter influência relevante sobre as células da linhagem osteoblástica, diferente de sua ação inibitória sobre os osteoclastos.

Reinholz et al.<sup>56</sup> (2000) estudaram a ação direta de vários bisfosfonatos sobre cultura de células osteoblásticas de fetos humanos, avaliando a proliferação celular, a expressão gênica e a formação óssea. O pamidronato e o zoledronato estimularam a diferenciação dos osteoblastos e aumentaram a formação óssea. No entanto, no caso do pamidronato, os efeitos diminuíram com o aumento da dose. O pamidronato não induziu a proliferação das células osteoblásticas, mas aumentou sua citodiferenciação, com produção de grande quantidade da proteína celular total, da FAO e de colágeno tipo I, ou seja, havendo a maturação dessas células para uma fase de deposição de matriz óssea.

Im et al.<sup>25</sup> (2004) estudaram os efeitos do alendronato e do risedronato sobre cultura de células osteoblásticas e observaram que ambos os bisfosfonatos aumentaram significativamente o número de células quando comparados ao grupo controle, atingindo maiores níveis de proliferação na concentração de  $10^{-8}$ mol. Observaram ainda ação aumentada da FAO, bem como um aumento da expressão gênica da proteína morfogenética óssea-2 (BMP-2), colágeno tipo I e da



osteocalcina. Os autores concluíram que os bisfosfonatos, além de apresentarem importante papel na inibição da reabsorção óssea pelos osteoclastos, são promotores da proliferação e maturação dos osteoblastos.

### 2.2.1 Alendronato sódico e a reparação tecidual

Dentre os bisfosfonatos, o alendronato de sódio é um dos mais potentes aminobisfosfonatos. É um sal monossódico trihidratado, derivado do ácido alendrônico, caracterizado como um pó branco cristalino, solúvel em água e com pH de quatro a cinco (SWEETMAN<sup>66</sup>, 2002).

De acordo com Budavari et al.<sup>8</sup> (1996) o fármaco é quimicamente descrito como 4-amino-1-hidroxibutilideno-1, 1-bisfosfonato, com fórmula estrutural  $C_4H_{13}NNaO_7P_2 \cdot 3H_2O$  de peso molecular 325,10g. Sua composição, formada com quatro carbonos e uma cadeia lateral do grupo amina, inibe a reabsorção óssea causada pelos osteoclastos.

O alendronato de sódio, um bisfosfonato de segunda geração, foi o primeiro largamente utilizado que apresentou dados convincentes sobre sua eficácia na redução de fraturas em pacientes com osteoporose. É também um potente inibidor da reabsorção óssea *in vitro*, em experimentos animais e em pacientes com doença de Paget (REDDY et al.<sup>55</sup>, 1995; FLEISCH<sup>19</sup>, 1997; KULAK & BILEZIKIAN<sup>35</sup>, 2000).

O primeiro medicamento contendo alendronato de sódio foi lançado pela Merck Sharp & Dohme (Fosamax® - comprimidos de 10 e 70mg) e recebeu a aprovação do FDA para comercialização e uso em 1995. No Brasil, o fármaco encontra-se disponível para administração oral, em comprimidos de alendronato monossódico, na forma triidratada

ou não, apresentando doses de 5, 10 e 70mg de ácido alendrônico por comprimido. Em fevereiro de 2004 foi registrado, no país, o primeiro medicamento genérico fabricado pela empresa Biossintética (comprimidos de alendronato de sódio 10mg) (FERNANDES<sup>15</sup>, 2005).

Sabe-se que o alendronato atua sobre as células ósseas, porém seu mecanismo de ação ainda não é bem definido. Estudos demonstram que o fármaco se incorpora ao osso nas lacunas de reabsorção e só será liberado localmente durante o processo de reabsorção óssea devido à acidificação do meio, aumentando sua concentração abaixo dos osteoclastos. Isso interfere no processo de reabsorção óssea e na formação das “bordas em escova” dos osteoclastos (SATO et al.<sup>61</sup> 1991). O mecanismo responsável, pela ação direta sobre os osteoclastos e seus precursores, parece estar relacionado com a inibição da via do mevalonato (FISHER et al.<sup>18</sup>, 1999).

Apesar de comprovada a sua ação sobre os processos de reabsorção óssea, poucos são os estudos que demonstram uma atividade relevante na reparação tecidual, inclusive no reparo ósseo.

Weinreb et al.<sup>76</sup> (1994) testaram em macacos a eficácia do alendronato na redução da reabsorção óssea provocada por doença periodontal induzida. Vinte e sete animais foram divididos em três grupos, os quais receberam por via endovenosa solução salina (placebo), solução de alendronato 0,05mg/kg ou 0,25mg/kg respectivamente, a cada duas semanas, durante 16 semanas. Os resultados das análises radiográficas e histomorfométricas demonstraram que apenas o grupo tratado com alendronato 0,05mg/kg obteve redução significativa da reabsorção óssea alveolar induzida pela periodontite experimental, e que não se percebeu efeito da medicação usada na concentração de 0,25mg/kg. Os autores sugerem que o alendronato, bem como os hormônios e fatores de crescimento, apresentam uma resposta bifásica, ou seja, que diferentes concentrações de alendronato podem dar diferentes resultados, daí a

necessidade de mais estudos para se determinar a relação dose-efeito desse fármaco.

Reddy et al.<sup>55</sup> (1995) utilizaram o alendronato em cães com doença periodontal, administrado por via oral na concentração de 3mg/Kg, semanalmente por um período de seis meses. Em seus resultados, puderam observar a diminuição da mobilidade dentária e, através de análise histomorfométrica, concluíram que esse bisfosfonato reduziu a perda óssea relativa à progressão da doença periodontal, com um aumento significativo da densidade óssea dos animais medicados, comparados aos animais do grupo não medicado.

Através de estudo realizado em ratos, Yaffe et al.<sup>81</sup> (1997) demonstraram pela primeira vez a ação local positiva do alendronato sobre a reabsorção alveolar provocada após a confecção de retalhos mucoperiosteais em cirurgia periodontal. A cirurgia foi realizada na região de pré-molar e molar mandibulares, com a exposição do osso alveolar e colocação de uma membrana embebida em 0,025ml de alendronato sobre o mesmo. A solução foi preparada dissolvendo 20mg de alendronato em 1ml de solução salina. Os autores observaram que houve uma redução significativa da reabsorção óssea ao final do experimento, com manutenção de 90% do osso, comparado ao grupo controle.

Meraw et al.<sup>42</sup> (1999) avaliaram, em cães, o efeito da aplicação local do alendronato na regeneração óssea guiada ao redor de implantes dentários. Foram colocados quatro tipos de implantes, todos protegidos por uma membrana de colágeno reabsorvível: implante de hidroxiapatita revestido por alendronato, implante de titânio revestido por alendronato, implante de hidroxiapatita e implante de titânio. Os resultados observados após 28 dias comprovaram que o alendronato contribuiu para a osseointegração em ambos os tipos de implante (hidroxiapatita e titânio).

Binderman et al.<sup>4</sup> (2000) realizaram um estudo em ratos para observar a efetividade da aplicação local de alendronato na redução da reabsorção óssea alveolar após a realização de cirurgia periodontal nesses animais. Num primeiro experimento, foi confeccionado retalho mucoperiosteal e os autores aplicaram, sobre o osso alveolar exposto, uma membrana embebida em diferentes concentrações de alendronato (0, 10, 50, 200 ou 400µg/ml). Num segundo experimento, a membrana com alendronato (0, 50, 200 ou 400µg/ml) foi colocada numa região à distância do sítio cirúrgico, na região esquerda da submucosa mentoniana. Foi realizada análise radiográfica dos processos alveolares e os resultados demonstraram que a aplicação tópica de 200 e 400µg/ml de alendronato foi significativamente efetiva na redução da perda óssea alveolar. A aplicação à distância de 400µg/ml de alendronato também diminuiu a reabsorção alveolar, sugerindo uma ação sistêmica do fármaco.

Silva<sup>64</sup> (2000) estudou a ação do alendronato na reparação óssea de ratas ovariectomizadas. A amostra incluía quatro grupos constituídos por nove ratas ovariectomizadas adultas e em cada animal foi realizada uma lesão na tíbia. O grupo controle não foi medicado, enquanto os outros três receberam na água de beber doses diárias de 0,25mg/Kg, 0,50mg/Kg, 0,75mg/Kg de alendronato. Após os períodos de três, sete e 14 dias de experimento, as ratas foram sacrificadas. Os resultados histológicos revelaram maior formação óssea nos grupos medicados com doses mais elevadas de alendronato. O grupo de 14 dias, com dose de 0,50mg/Kg, apresentou trabéculas mais maduras e organizadas, sugerindo um processo de remodelação óssea mais desenvolvido, demonstrando a ação dose-dependente do alendronato sódico.

Fayad<sup>14</sup> (2001) avaliou as ações de duas formulações de bisfosfonatos no processo de reparação óssea em defeitos realizados em mandíbula de ratos. Esses animais foram divididos em cinco grupos,

sendo: um controle, um medicado com alendronato durante dez dias, iniciando o tratamento no dia da cirurgia; um medicado com clodronato durante dez dias, iniciando o tratamento no dia da cirurgia; um medicado com alendronato durante dez dias, iniciando o tratamento cinco dias antes da cirurgia e um medicado com clodronato durante dez dias, iniciando o tratamento cinco dias antes da cirurgia; todos na dose de 1mg/Kg/dia. O autor concluiu que o alendronato e o clodronato não estimularam a reparação óssea neste modelo experimental e que a administração prévia à confecção do defeito não apresentou ação benéfica no processo de reparo.

Fernandes<sup>16</sup> (2002) avaliou a ação do alendronato sódico e sua associação com hidroxiapatita pura granular na reparação de defeitos ósseos na mandíbula de coelhos. Foram utilizados 27 animais, divididos em três grupos: grupo controle, grupo medicado com alendronato sódico e grupo medicado associado com preenchimento do defeito com a hidroxiapatita. O alendronato foi administrado via oral numa dose de 1mg/Kg nos grupos medicados. Após os períodos de 14, 21 e 28 dias, os animais foram sacrificados e os resultados demonstraram que não houve diferença entre os tratamentos, apenas entre os períodos de observação. Concluiu-se que o uso do alendronato sódico e sua associação com a hidroxiapatita não interferiram na reparação óssea nesse modelo experimental.

Matsura<sup>40</sup> (2003) avaliou a ação do gel de alendronato de sódio na reparação de defeitos infra-ósseos periodontais em humanos. Posteriormente aos procedimentos básicos de orientação de higiene bucal, raspagem e aplanamento corono-radicular, foi realizado o tratamento cirúrgico de 28 defeitos periodontais infra-ósseos de duas a três paredes em dentes unirradiculares, com bolsas periodontais maiores ou iguais a 4mm. Os grupos controle e teste apresentaram retração gengival e redução da profundidade clínica de sondagem noventa dias após os procedimentos cirúrgicos. Houve, no grupo controle, ganho

clínico de inserção médio de 0,85mm, o que não ocorreu no grupo teste. O autor não verificou alteração estatisticamente significativa no tecido ósseo em nenhum dos grupos

Kawata et al.<sup>34</sup> (2004) analisaram o efeito do alendronato sódico numa concentração de  $10^{-4}$ mol dissolvido em solução salina, sobre a reabsorção de enxerto ósseo inserido no subcutâneo de camundongos. Os autores notaram que no grupo não medicado (controle), o enxerto desapareceu após cinco semanas. Já no grupo experimental, no qual o enxerto ósseo foi embebido na solução de alendronato, houve uma reabsorção óssea de somente 20 a 40% no mesmo período. O grupo experimental também foi subdividido em dois grupos que receberam ou não injeção intraperitoneal de alendronato após cinco semanas da realização do enxerto. O grupo medicado demonstrou redução significativa no número de osteoclastos após nove semanas da cirurgia. Os autores puderam concluir que o alendronato na concentração de  $10^{-4}$ mol inibiu a reabsorção óssea do enxerto ósseo ectópico.

Reddy et al.<sup>54</sup> (2004) formularam um gel com alendronato e avaliaram sua ação por seis meses, no tratamento de lesões ósseas decorrentes de periodontite em humanos. Os resultados revelaram uma melhora significativa nos parâmetros clínicos estudados (índice gengival, profundidade de bolsa periodontal e nível de inserção clínica), além de demonstrarem um potente efeito inibitório sobre a reabsorção óssea e um aumento na formação óssea local.

Altundal & Güvener<sup>2</sup> (2004) estudaram o efeito do alendronato na inibição da reabsorção óssea alveolar após extração dentária de ratos WKY machos. Os animais foram divididos em três grupos: um grupo controle, um grupo tratado com solução salina diariamente e um grupo tratado com alendronato subcutâneo, administrado diariamente a 0,25mg/Kg. Os resultados demonstraram que a reabsorção óssea alveolar vestibulo-lingual foi significativamente menor que aquela encontrada nos outros grupos. Os autores também

encontraram uma redução significativa dos níveis de cálcio sérico e urinário, além de um menor número de osteoclastos presentes na região, revelando a supressão da reabsorção óssea alveolar no grupo tratado com alendronato.

Shibata et al.<sup>63</sup> (2004) avaliaram o efeito do tratamento local prévio com alendronato em raízes de molares para reimplante dentário, avaliando a função de suporte do ligamento periodontal cicatrizado após sete, 14 e 21 dias. Os autores concluíram que o tratamento prévio com alendronato, quando comparado ao grupo controle tratado apenas com solução salina, inibiu a formação de tecido mineralizado no periodonto e a inibiu a anquilose, restaurando a função de suporte do ligamento periodontal.

Correia<sup>12</sup> (2005) avaliou a citotoxicidade *in vitro* do alendronato de sódio sobre fibroblastos do ligamento periodontal de humanos em cultura celular. O grupo controle G1 não recebeu medicação e os grupos G2, G3 e G4 receberam alendronato nas concentrações de  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  mol respectivamente, em diferentes tempos experimentais. Os resultados mostraram que as culturas tratadas com a maior concentração da droga (G2), apresentaram porcentagens de viabilidade celular significativamente menores, que as dos outros grupos (G1, G3 e G4) nos tempos de 12 e 24 horas. O grupo G2 apresentou crescimento significativamente menor que dos demais grupos. A autora concluiu que o alendronato de sódio, em contato direto com os fibroblastos do ligamento periodontal em cultura, é citotóxico em concentrações mais elevadas ( $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  mol).

Jaime et al.<sup>29</sup> (2005) estudaram a influência da administração local de alendronato sódico no reparo ósseo em ratas ovariectomizadas. Foram utilizadas 24 ratas, que sofreram ovariectomia ou falsa-ovariectomia aos três meses de idade, e após o período de um mês, foram submetidas à cirurgia de confecção do defeito de 8mm de diâmetro na região da calvária. Os animais do grupo teste tiveram o defeito ósseo

preenchido com esponja de colágeno reabsorvível embebida em solução de alendronato sódico na concentração de 20mg/ml e os do grupo controle em solução fisiológica. Após trinta dias da cirurgia, as ratas foram sacrificadas e os resultados demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa em relação à formação óssea entre os grupos, após a análise histomorfométrica. Histologicamente, todos os grupos apresentaram-se muito semelhantes, com pouca formação óssea nas bordas da lesão, que estava preenchida por tecido conjuntivo fibroso. Os autores concluíram que a ovariectomia e/ou aplicação tópica de alendronato não influenciaram no reparo ósseo na calvária de ratas.

Fernandes<sup>17</sup> (2005) estudou a ação local do alendronato sódico, da hidroxiapatita e da associação do alendronato com a hidroxiapatita, no reparo ósseo de fêmures de ratos. Um defeito ósseo medindo 2,5mm de diâmetro foi confeccionado no fêmur de 168 ratos, os quais foram divididos em sete grupos de acordo com o material de preenchimento utilizado: controle (sem preenchimento), amido, alendronato 1mol, alendronato 2mol, hidroxiapatita 1mol, hidroxiapatita 2mol e alendronato mais hidroxiapatita. O exame histomorfológico demonstrou que, nos grupos sacrificados após sete dias, observou-se neoformação óssea com trabéculas imaturas em todos os grupos, exceto nos animais machos nos quais o alendronato foi utilizado. Aos 21 dias, as trabéculas praticamente fechavam o defeito na maioria dos espécimes estudados. O autor concluiu que a reparação óssea foi maior nas fêmeas do que nos machos, independente do período estudado. No entanto, os resultados demonstraram que o alendronato sódico, associado ou não à hidroxiapatita, interferiu negativamente no processo de reparação óssea neste modelo experimental.

Alguns estudos demonstram uma resposta tecidual bifásica ao uso do alendronato de sódio, ou seja, a droga pode inibir ou estimular a formação óssea dependendo da dose empregada e da forma de administração (WEINREB et al.<sup>76</sup>, 1994; SILVA<sup>64</sup>, 2000; BINDERMAN



et al.<sup>4</sup>, 2000; CORREIA<sup>12</sup>, 2005). Uma vez que a sua administração pode contribuir para a neoformação óssea, investiga-se a ação local de diferentes concentrações de alendronato sódico no processo de reparo ósseo.

### **3 PROPOSIÇÃO**

Estudar a ação local do alendronato sódico na reparação de defeitos ósseos em fêmures de ratos hipertensos (SHR) de ambos os sexos, em diferentes períodos experimentais.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 Animais

Esta pesquisa foi realizada seguindo os princípios éticos para a experimentação animal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Anexo A).

Foram utilizados oitenta ratos espontaneamente hipertensos (SHR), sendo quarenta machos e quarenta fêmeas, com aproximadamente seis meses de idade, pesando em torno de 300g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas – USP e permaneceram durante o período experimental nas dependências do Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP.

Os ratos ficaram acondicionados, durante todo o experimento, em gaiolas coletivas à temperatura ambiente, recebendo ração (Guabi – Nutrilabor) e água *ad libitum*.

## 4.2 Divisão dos grupos

Os oitenta animais foram divididos em quatro grupos experimentais constituídos por vinte animais (Quadro 1): C (controle), Am (amido), A1 (alendronato 1mol) e A2 (alendronato 2moles). Todos os animais foram submetidos à cirurgia para confecção de um defeito ósseo. No grupo controle (C) os ratos foram submetidos apenas à cirurgia, não recebendo qualquer preenchimento do defeito. Os animais do grupo amido (Am), após serem submetidos ao ato cirúrgico, receberam preenchimento do defeito ósseo apenas com o amido, excipiente utilizado no experimento. Os animais do grupo (A1) receberam 1mol de alendronato sódico, associado ao amido, para completo preenchimento do defeito ósseo. Finalmente, o grupo (A2) teve o defeito cirúrgico totalmente preenchido por 2mol de alendronato sódico, também associado ao amido.

Quadro 1 – Divisão dos animais por grupos experimentais, número e sexo

Grupos experimentais	Machos	Fêmeas
Controle (C)	n = 10	n = 10
Amido (Am)	n = 10	n = 10
Alendronato 1mol (A1)	n = 10	n = 10
Alendronato 2mol (A2)	n = 10	n = 10

n = número de animais

### 4.3 Fármaco

O fármaco utilizado para preenchimento ósseo em nosso estudo foi um bisfosfonato de segunda geração, o alendronato sódico na sua apresentação pura. O amido desempenhou papel de excipiente por ser inerte ao alendronato. Para avaliar se ele influenciou ou não no processo de reparo, realizamos também um grupo experimental utilizando apenas o amido.

O alendronato sódico e o amido empregados nesta pesquisa foram cedidos pela Farmácia Escola da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara - UNESP.

Seguindo o protocolo desenvolvido por Fernandes<sup>17</sup> (2005) em sua pesquisa, foi realizada a administração local de alendronato sódico na quantidade de 1mol (A1) e 2mol (A2) para o preenchimento dos defeitos ósseos.

As proporções dos materiais foram calculadas de acordo com o peso molecular (PM) do alendronato sódico, que equivale a 325g/mol. O cálculo das quantidades em peso foi realizada utilizando-se 0,01mol, para mensurarmos quantias volumétricas apropriadas ao tamanho do defeito ósseo, isto é, utilizamos 3,25g no grupo experimental A1 e 6,5g no grupo experimental A2. Deste modo, foi possível acompanhar as definições já estabelecidas por Fernandes<sup>17</sup> (2005), como pode ser visto no Quadro 2. Com esta quantidade de material, preenchemos 26% do defeito com alendronato sódico no grupo A1 e 52% no grupo A2, sendo o restante dos defeitos ósseos preenchidos com 74% e 48% de amido, respectivamente.

Quadro 2 - Porcentagem e peso dos materiais utilizados (FERNANDES<sup>17</sup>, 2005)

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

Como se pode notar neste quadro, o autor tomou por referência a hidroxiapatita (HA), por apresentar o maior PM, para calcular as proporções percentuais das substâncias para o preenchimento de 100% do defeito ósseo, nos diversos grupos experimentais.

Visto serem poucos os relatos na literatura que padronizam a administração local e a dose do alendronato sódico no processo de reparo ósseo, a opção pelas proporções mencionadas no Quadro 2 permitirá comparar os nossos resultados com os obtidos por Fernandes<sup>17</sup> (2005). Seguindo a mesma linha de pesquisa desenvolvida por este autor, estabelecemos então, bases adequadas para comparação dos resultados em relação à reparação óssea.

Os materiais foram pesados em balança de precisão (AB 204 - Metter Toledo) e misturados através de agitação, conforme recomendações de manipulação, tendo sido posteriormente armazenados em frascos de vidro.

#### **4.4 Procedimentos cirúrgicos**

As cirurgias foram realizadas na sala cirúrgica do Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, a qual recebeu adequada limpeza e desinfecção das suas superfícies, anterior à utilização de campos cirúrgicos estéreis. No momento da cirurgia, o operador e o auxiliar estavam devidamente paramentados com equipamento de proteção individual (avental, gorro, máscara, luvas e óculos de proteção). Todo o instrumental cirúrgico estava adequadamente esterilizado para o uso.

Foi realizado um procedimento cirúrgico para a confecção de um defeito ósseo de 2,5mm de diâmetro no fêmur esquerdo de todos os animais envolvidos no experimento.

Uma vez realizada a pesagem prévia dos animais, estes receberam indução anestésica, empregando-se uma mistura de solução aquosa de cloridrato de xilasina a 2% (Rompun – Bayer do Brasil), medicamento sedativo e relaxante muscular, e de ketamina base (Dopalen - Agribrands do Brasil), anestésico geral, na proporção de 1:0,5 respectivamente. A dosagem da solução injetada foi de 0,1ml/100g, utilizando-se uma seringa descartável de 1ml por via intramuscular.

Após a anestesia, foi realizada a depilação da região do fêmur esquerdo e a antisepsia da pele com solução aquosa de polividona, com 10% de iodo ativo, por fricção com gaze estéril. Posteriormente, com uma lâmina de bisturi nº15 montada em cabo Bard &

Parker, realizou-se uma incisão longitudinal ao fêmur de aproximadamente 2,5cm de extensão, na pele e na fáscia muscular da região do terço distal do fêmur esquerdo (Figura 1a).

A divulsão da musculatura foi realizada utilizando-se tesoura reta de ponta romba (Figura 1b), para posterior incisão e descolamento do perióstio até a completa exposição do tecido ósseo (Figura 1c).

A confecção do defeito ósseo foi realizada utilizando-se uma broca trefina de 2,5mm de diâmetro externo, no local de maior extensão lateromedial da região distal da diáfise do fêmur, até o rompimento da cortical óssea externa (Figura 1d). Todo procedimento recebeu abundante irrigação com solução de cloreto de sódio estéril a 0,9%.

Os materiais foram levados para o interior do defeito através da utilização de um porta-amálgama, e acomodados com o auxílio de um condensador, misturando-se ao sangue proveniente da própria ferida cirúrgica (Figura 1e). O preenchimento dos defeitos ósseos seguiu a especificação do material correspondente a cada grupo:

- a) Grupo Controle (C): não foi realizado o preenchimento do defeito;
- b) Grupo Amido (Am): o defeito foi completamente preenchido com amido (excipiente);
- c) Grupo 1mol de alendronato (A1): o defeito foi completamente preenchido com 3,25g de alendronato sódico e 9,19g de amido;
- d) Grupo 2mol de alendronato (A2): o defeito foi completamente preenchido com 6,50g de alendronato sódico e 5,94g de amido.



Posteriormente, foi realizada a irrigação da musculatura e pele com soro fisiológico e os tecidos foram delicadamente reposicionados por meio de sutura da camada muscular com fio absorvível (Cirumédica n° 4) e da pele com fio seda (Ethicon – Johnson & Johnson n° 4). Após a sutura, nova antissepsia da pele foi efetuada com solução aquosa de polividona (Figura 1f).

Em seguida, os animais foram colocados em gaiolas, levando em média trinta minutos para retornarem do estado de analgesia, quando se verificava a retomada dos reflexos normais, através da resposta ao estímulo do membro inferior.

#### 4.5 Sacrifício

O sacrifício dos animais foi executado por meio de anestesia e decapitação em guilhotina, decorridos sete e 21 dias da data da cirurgia (Quadro 3).

Quadro 3 – Divisão dos animais em grupos e período de sacrifício

Grupos		Tempo de Sacrifício	
		7 dias	21 dias
Controle (C)	Macho	n = 5	n = 5
	Fêmea	n = 5	n = 5
Amido (Am)	Macho	n = 5	n = 5
	Fêmea	n = 5	n = 5
Alendronato 1mol (A1)	Macho	n = 5	n = 5
	Fêmea	n = 5	n = 5
Alendronato 2mol (A2)	Macho	n = 5	n = 5
	Fêmea	n = 5	n = 5

n = número de animais

#### 4.6 Análise do defeito ósseo

Os fêmures esquerdos dos animais foram removidos e fixados em solução de formaldeído a 10% durante o período mínimo de 48 horas. Após a fixação dos tecidos, as peças foram descalcificadas em solução de ácido fórmico a 20%, durante aproximadamente dez dias, no Laboratório de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo - USP. As peças foram, posteriormente, processadas e incluídas em blocos de

parafina para que fossem confeccionados cortes transversais da área do defeito, com aproximadamente 5 $\mu$ m de espessura. As secções foram realizadas em toda extensão do defeito, de forma semi-seriada e as lâminas coradas com hematoxilina-eosina (HE).

#### 4.6.1 Análise histomorfológica

Foram realizadas as avaliações histológicas com relação ao tecido ósseo neoformado em toda extensão do defeito, sendo observadas as características das trabéculas ósseas imaturas e remodelação das mesmas, dos espaços medulares e da remodelação óssea na superfície de corte. A morfologia das células ósseas encontradas também foi analisada e descrita.

#### 4.6.2 Análise histomorfométrica

Todas as lâminas foram fotografadas na região central do defeito com um aumento original de cem vezes, através da câmara digital Cyber Shott modelo DSC-585 (Sony Corporation) acoplada ao microscópio de luz Zeiss Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). As imagens foram visualizadas em um monitor de TV e, depois de digitalizadas, foram transferidas para um microcomputador e submetidas à análise histométrica da neoformação óssea. Para isso, foi empregado o método da planimetria por contagem de pontos, utilizando o programa Image-J (Versão 1,32 para *Windows*), de domínio público, do Instituto Nacional de Saúde (NIH), Bethesda, EUA.

Utilizou-se um retículo quadriculado composto por dez linhas verticais e dez horizontais, formando cem pontos de intersecção. O retículo posicionado sobre a região central da imagem histológica do defeito ósseo foi empregado para a conferência do número de pontos de intersecção sobrepostos ao tecido ósseo neoformado. A partir de uma

amostragem sistemática, foram selecionados para análise dois cortes histológicos das lâminas número um, três e cinco de cada animal. Desta forma foram avaliados seis cortes por espécime, totalizando seiscentos pontos analisados por animal. Os valores encontrados, então transformados em porcentagem, foram submetidos à análise estatística.

#### 4.6.3. Análise estatística

Os resultados obtidos da análise histomorfométrica foram submetidos à análise estatística descritiva e à análise de variância (ANOVA), utilizando como nível de significância a margem de erro de 5%. Foram analisados os tratamentos dos quatro grupos de animais (C, Am, A1, A2), os dois períodos de observação (sete e 21 dias) e o sexo dos animais (macho e fêmea). Quando necessário, foi aplicado o teste de comparação múltipla de Tukey (5%).

Para a realização da análise estatística e a confecção do gráfico, utilizou-se o *software* Statistica 6.0 e Excel 2003.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Análise histomorfológica**

Os cortes histológicos analisados referem-se aos fêmures de ratos SHR, que foram seccionados transversalmente na região do defeito ósseo.

Os animais apresentaram características histológicas distintas de acordo com o grupo experimental, o sexo e o período de observação. Dessa forma, a descrição histomorfológica dos espécimes foi realizada separando os grupos por sexo e período de observação, para facilitar a comparação da neoformação óssea evidenciada nos diferentes grupos experimentais.

Numa primeira vista panorâmica dos cortes, pôde-se observar a cortical óssea do fêmur, o canal medular, a área do defeito ósseo e os tecidos moles adjacentes, como o tecido muscular remanescente.

Os detalhes do processo de neoformação óssea foram descritos numa maior aproximação, sendo possível evidenciar as características do tecido osteóide, das trabéculas ósseas e das células osteogênicas.

### 5.1.1 Animais machos - sete dias

Na análise histológica dos espécimes, observava-se o corte transversal do fêmur na área do defeito ósseo. Este apresentava suas bordas nítidas e evidentes (Figura 2).

Ocupando a área do defeito ósseo, foi encontrado um tecido conjuntivo frouxo, bastante celularizado, com focos de hemorragia (Figura 3a, 3b) e infiltrado inflamatório em todos os grupos experimentais. O interior do canal medular caracterizava-se pela presença de quantidade variável de tecido medular (Figura 2a, 2b, 2c, 2d).

Alguns espécimes dos grupos controle (C) e amido (Am), ainda apresentavam focos de tecido osteóide imaturo em meio ao tecido conjuntivo frouxo (Figura 3b).

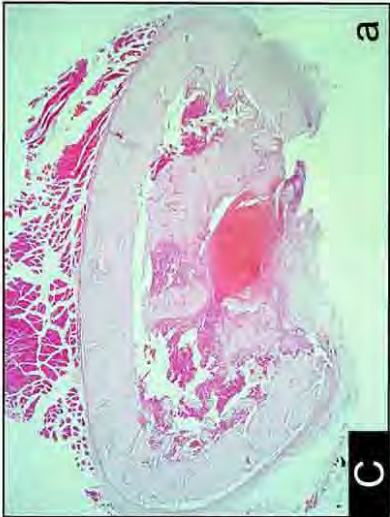
Contudo, nos animais machos aos sete dias, não foi observada a presença de trabéculas ósseas organizadas na área do defeito ósseo (Figura 2; Figura 3).

Todos os espécimes referentes aos grupos alendronato 1mol (A1) e alendronato 2mol (A2) apresentavam uma rede de fibrina em meio ao tecido conjuntivo na área do defeito ósseo, com ausência de formação óssea. (Figura 3c e 3d) Alguns espécimes dos grupos tratados com alendronato sódico também apresentavam degeneração hidrópica (Figura 3c) no tecido conjuntivo.

Nesta fase, não se observava a presença do perióstio sobre a área do defeito ósseo. Em alguns espécimes, pôde-se observar o tecido muscular recobrimo parcialmente a superfície do defeito ósseo (Figura 3c).

Uma característica histológica marcante observada nos animais dos grupos A1 e A2, em particular neste último, foi a presença de formações ósseas extra-corticais subperiosteais na região oposta ao defeito ósseo, nas faces medial e lateral do osso (Figura 2d).

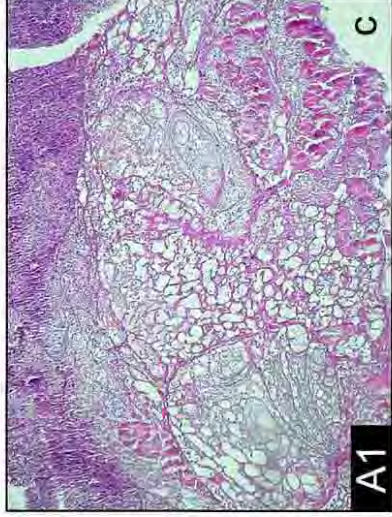
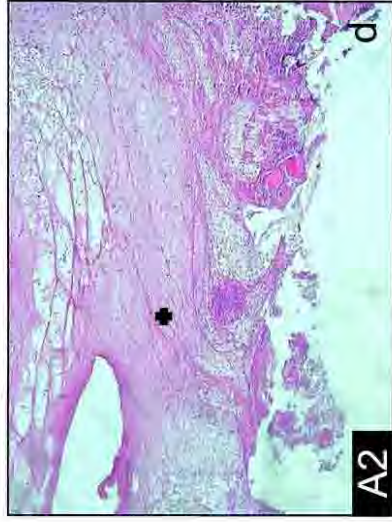
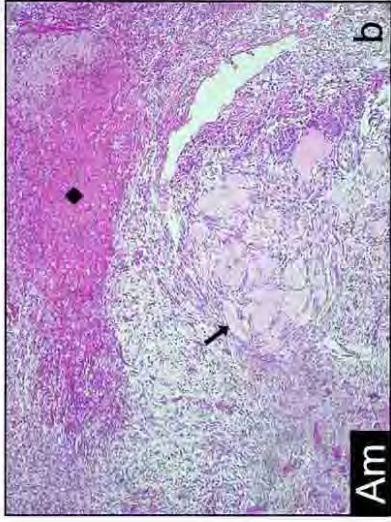
FIGURA 2 - SHR machos, sete dias (vista panorâmica): **a) grupo C:** foco de hemorragia na área do defeito; **b) grupo Am:** hemorragia na área do defeito; **c) grupo A1:** rede de fibrina no conjuntivo preenchendo o defeito; **d) grupo A2:** rede de fibrina no defeito ósseo e tecido ósseo extra-cortical subperiosteal neoformado (→) HE. Aumento original de 25x.





O tecido ósseo extra-cortical subperiosteal neoformado mostrava características de tecido ósseo imaturo, com poucas trabéculas limitando amplos espaços medulares contendo tecido conjuntivo frouxo. O perióstio e o tecido muscular recobriam o tecido ósseo extra-cortical.

FIGURA 3 - SHR machos, sete dias (centro do defeito): **a) grupo C:** tecido conjuntivo frouxo com foco de hemorragia na área do defeito (◆); **b) grupo Am:** áreas de hemorragia na área do defeito (◆) e deposição de matriz osteóide (→); **c) grupo A1:** rede de fibrina e degeneração hidrópica no tecido conjuntivo preenchendo o defeito; **d) grupo A2:** rede de fibrina na área do defeito ósseo (+). HE. Aumento original de 100x.



## Animais fêmeas - sete dias

As características gerais visualizadas no grupo de animais fêmeas, aos sete dias, foram semelhantes às aquelas observadas no grupo anterior, dos animais machos, do mesmo período de observação.

Numa vista panorâmica, observava-se o fêmur num corte transversal, com as bordas do defeito ósseo visíveis nos espécimes de todos os grupos estudados. O tecido muscular encontrava-se recoberto parcialmente o fêmur dos animais (Figura 4).

Da mesma forma como foi constatado nos animais machos, os defeitos ósseos das fêmeas também mostravam áreas de hemorragia no interior do tecido conjuntivo, principalmente nos espécimes do grupo C (Figura 4a; Figura 5a). Outras vezes, a hemorragia já se mostrava substituída por um tecido conjuntivo bastante celularizado e vascularizado (Figura 4b; Figura 5b).

Os espécimes dos grupos A1 e A2 apresentavam uma rede de fibrina que se tornava evidente na área do defeito ósseo e, muitas vezes, invadia o canal medular (Figura 4c; 4d; Figura 5c; 5d).

A presença de focos de tecido osteóide no tecido conjuntivo frouxo foi um achado histológico encontrado em alguns espécimes grupos C, Am e A2 (Figura 5d). Tal formação de matriz osteóide não foi encontrada nos animais do grupo A1. Já nos animais machos aos sete dias, nenhum grupo tratado com alendronato sódico apresentava esse achado histológico.

A formação óssea extra-cortical subperiosteal nas fêmeas também foi constatada nos animais tratados com alendronato sódico (Figura 4c, 4d). Essa formação óssea já se mostrava maior e mais evidente nos animais fêmeas quando comparado ao grupo de animais machos.

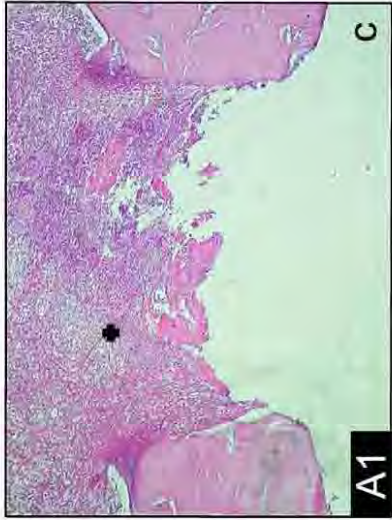
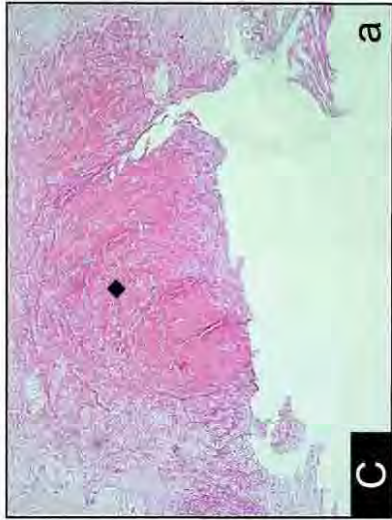
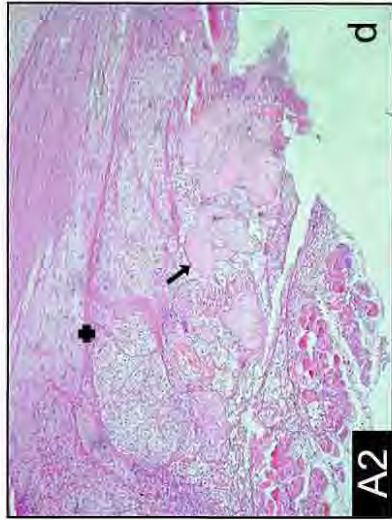
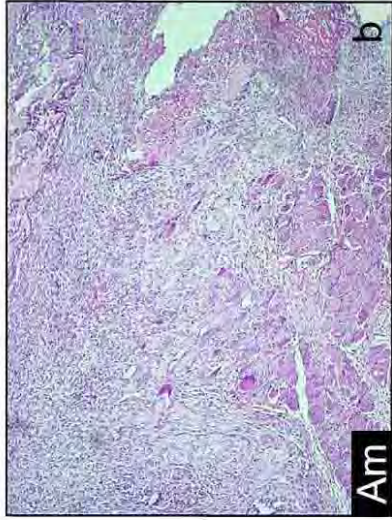
Figura 4 - SHR fêmeas, sete dias (vista panorâmica): **a) grupo C:** foco de hemorragia na área do defeito; **b) grupo Am:** ausência de hemorragia e presença de tecido conjuntivo na área do defeito; **c) grupo A1:** rede de fibrina no conjuntivo preenchendo o defeito e formação óssea extra-cortical subperiosteal (→) **d) grupo A2:** rede de fibrina na área do defeito ósseo e detalhe da formação óssea extra-cortical subperiosteal (→). HE. Aumento original de 25x.



Aos sete dias, o tecido ósseo extra-cortical subperiosteal neoformado mostrava-se composto por trabéculas ósseas delgadas, que se anastomosavam e limitavam amplos espaços medulares contendo tecido conjuntivo frouxo. O tecido neoformado continha osteócitos volumosos em grande quantidade, que se encontravam abrigados em amplas lacunas. O perióstio e o tecido muscular recobriam o tecido ósseo extra-cortical (Figura 10a).

Figura 5 - SHR fêmeas, sete dias (centro do defeito): **a) grupo C:** foco de hemorragia na área do defeito (→); **b) grupo Am:** tecido conjuntivo frouxo com deposição de fibras colágenas; **c) grupo A1:** rede de fibrina no conjuntivo preenchendo o defeito (◆); **d) grupo A2:** rede de fibrina (◆) e matriz osteóide na área do defeito ósseo (→). HE. Aumento original de 100x.





### 5.1.3 Animais machos - 21 dias

A avaliação histomorfológica realizada nos grupos C e Am, aos 21 dias, apresentava o fechamento do defeito ósseo em toda a sua extensão, com a presença de um tecido ósseo neoformado que se continuava com o tecido cortical adjacente ao defeito (Figura 6a, 6b). Nesses espécimes, observava-se a presença de trabéculas ósseas, que se anastomosavam e limitavam espaços ocupados por tecido medular (Figura 7a, 7b).

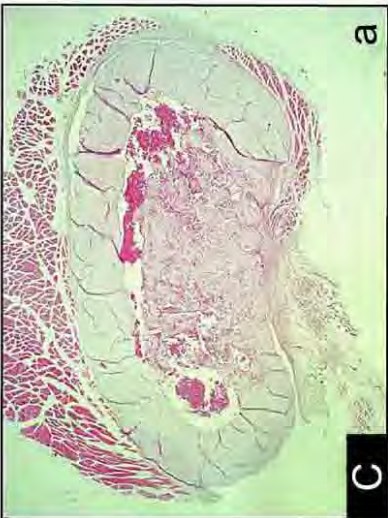
Em alguns espécimes dos grupos C e Am, foi observada a presença de um tecido conjuntivo fibroso recobrendo o tecido ósseo neoformado, com o perióstio bem definido, (Figura 7a, 7b).

Nos espécimes do grupo A1, também se observava a presença de trabéculas ósseas neoformadas, porém estas se mostravam mais delgadas e com aspecto imaturo (Figura 7c). O osso trabecular continha osteócitos volumosos em grande quantidade, no interior de amplas lacunas. Entre as trabéculas, observava-se a presença de grandes espaços medulares preenchidos com tecido conjuntivo frouxo, ricamente celularizado e vascularizado (Figura 7c, Figura 10c).

No entanto, o tecido ósseo neoformado não fechava totalmente a extensão do defeito nos espécimes do grupo A1. Caracterizava-se por assumir um padrão histológico distinto, no qual as trabéculas ósseas, ao nosso ver, se projetavam do canal medular em direção à área do defeito (Figura 6c). Tudo indica que as trabéculas ósseas se formaram a partir do endóstio adjacente à superfície de corte. Essa característica não foi observada em nenhum outro grupo de animais.

Nos defeitos ósseos dos animais do grupo A2, somente foi constatada a presença de um tecido conjuntivo frouxo, com pequena deposição de tecido osteóide no seu interior (Figura 7d). Alguns casos também mostravam áreas de hemorragia presentes na área do defeito ósseo (Figura 6d; Figura 7d). Nos animais do deste grupo, não se

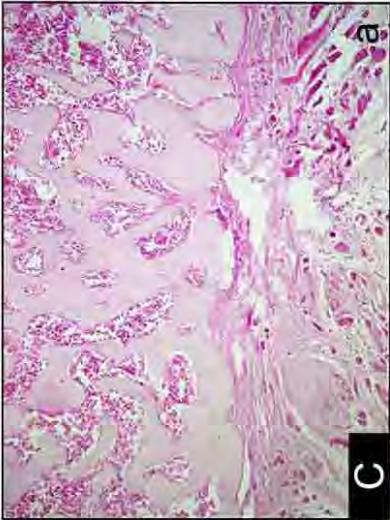
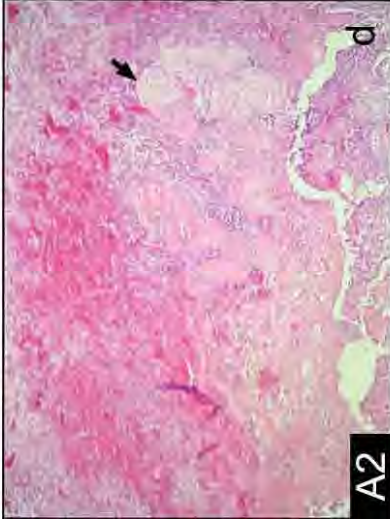
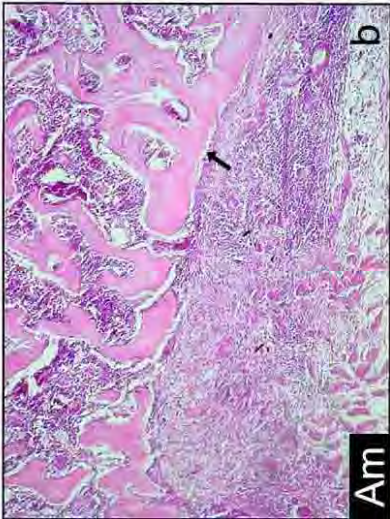
Figura 6 - SHR machos, 21 dias (vista panorâmica): **a) grupo C:** defeito ósseo fechado em extensão; **b) grupo Am:** anastomoses das trabéculas na superfície externa do defeito; **c) grupo A1:** trabéculas ósseas partindo do canal medular em direção ao defeito ósseo (◆); **d) grupo A2:** rede de fibrina na área do defeito ósseo e neoformação óssea extra-cortical (→). HE. Aumento original de 25x.



evidenciava a formação de trabéculas ósseas maduras fechando o defeito ósseo em toda sua extensão (Figura 6d; Figura 7d).

No grupo A1 e, principalmente, no grupo A2 observava-se uma neoformação óssea extra-cortical subperiosteal, nas faces medial e lateral do osso (Figura 6d). Aos 21 dias, o osso extra-cortical caracterizava-se pela presença de trabéculas ósseas mais maduras, regularmente distribuídas, que delimitavam espaços medulares preenchidos por tecido conjuntivo frouxo.

Figura 7 - SHR machos, 21 dias (centro do defeito): **a) grupo C:** trabéculas ósseas anastomosadas limitando espaços medulares com tecido conjuntivo frouxo **b) grupo Am:** tecido ósseo neoformado recoberto por perióstio na área do defeito ósseo (→); **c) grupo A1:** trabéculas ósseas imaturas e superfície externa da área do defeito ósseo recoberta por tecido conjuntivo fibroso; **d) grupo A2:** tecido conjuntivo, com áreas de hemorragia, deposição de fibras colágenas e tecido osteóide (→). HE. Aumento original de 100x.



#### 5.1.4 Animais fêmeas - 21 dias

Os achados histológicos do tecido ósseo nos grupos C e Am foram semelhantes aos encontrados nos machos ao 21 dias, havendo o fechamento de toda a extensão do defeito ósseo na maioria dos espécimes analisados (Figura 8a, 8b).

A porção mais externa do defeito ósseo aparecia formada por um tecido ósseo mais maduro e compacto (Figura 9a, 9b), recoberto por um tecido conjuntivo fibroso (Figura 9b). Em algumas regiões observavam-se áreas de remodelamento ósseo, evidenciando assim um arranjo semelhante ao lamelar (Figura 10d).

O perióstio mostrava-se bem definido nos animais dos grupos C e Am. Este se constituía por uma camada superficial de tecido conjuntivo fibroso e uma camada profunda formada por osteoblastos achatados (Figura 10d).

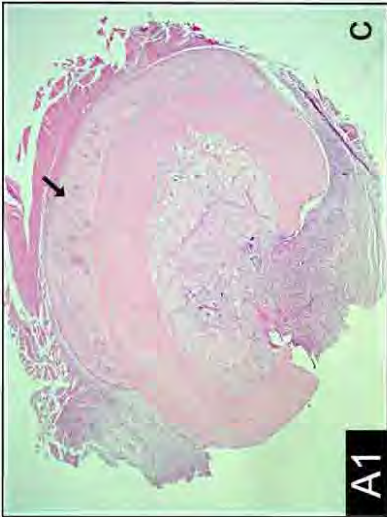
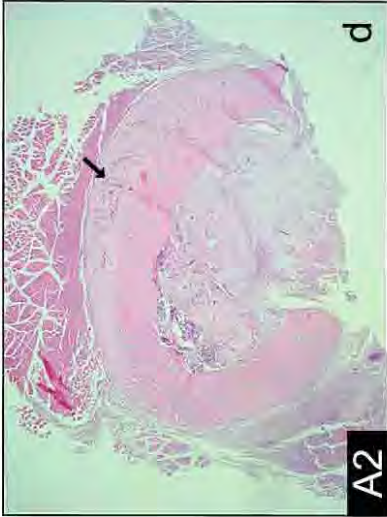
O tecido ósseo neoformado, observado aos 21 dias, mostrava-se formado por osso lamelar com lacunas contendo osteócitos menos volumosos e achatados (Figura 10d). Os osteoblastos de formato achatado margeavam as trabéculas ósseas.

No entanto, nos grupos A1 e A2 não se observava a organização de trabéculas ósseas na área do defeito (Figura 8c, 8d). Constatava-se apenas a presença de tecido conjuntivo frouxo (Figura 9c e 9d), com deposição de feixes de fibras colágenas dispostas aleatoriamente, bem como a presença de mínima deposição de matriz osteóide em alguns casos.

As formações ósseas subperiosteais na região oposta ao defeito ósseo estavam presentes em todos os grupos tratados com alendronato 1mol (A1) e 2mol (A2) e mostravam-se mais expressivas nos animais fêmeas quando comparado aos animais machos, aos 21 dias (Figura 8c, 8d; Figura 10b). O tecido neoformado encontrava-se recoberto pelo perióstio e tecido muscular (Figura 10b). Continha osteócitos em

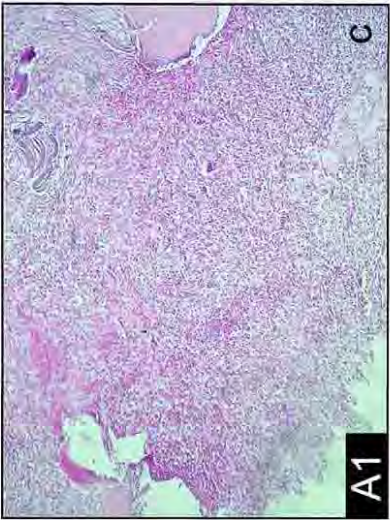
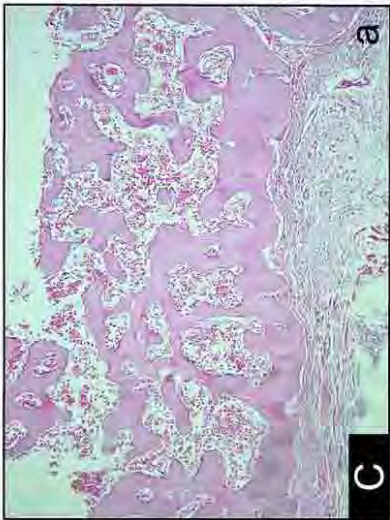
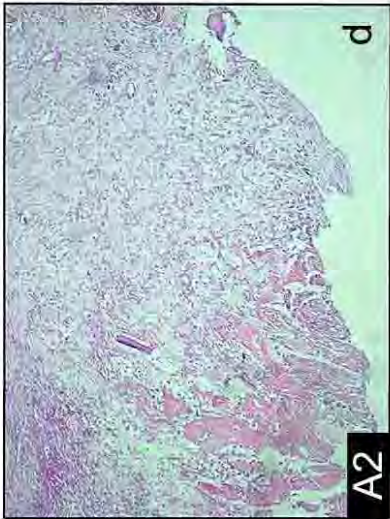
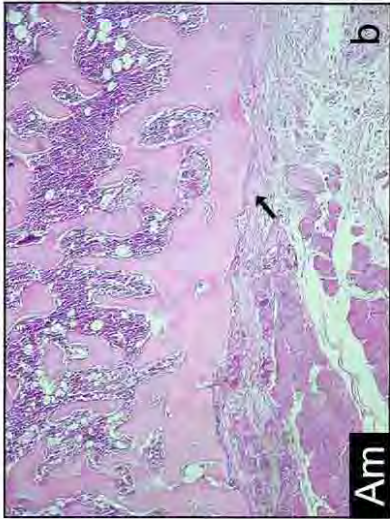


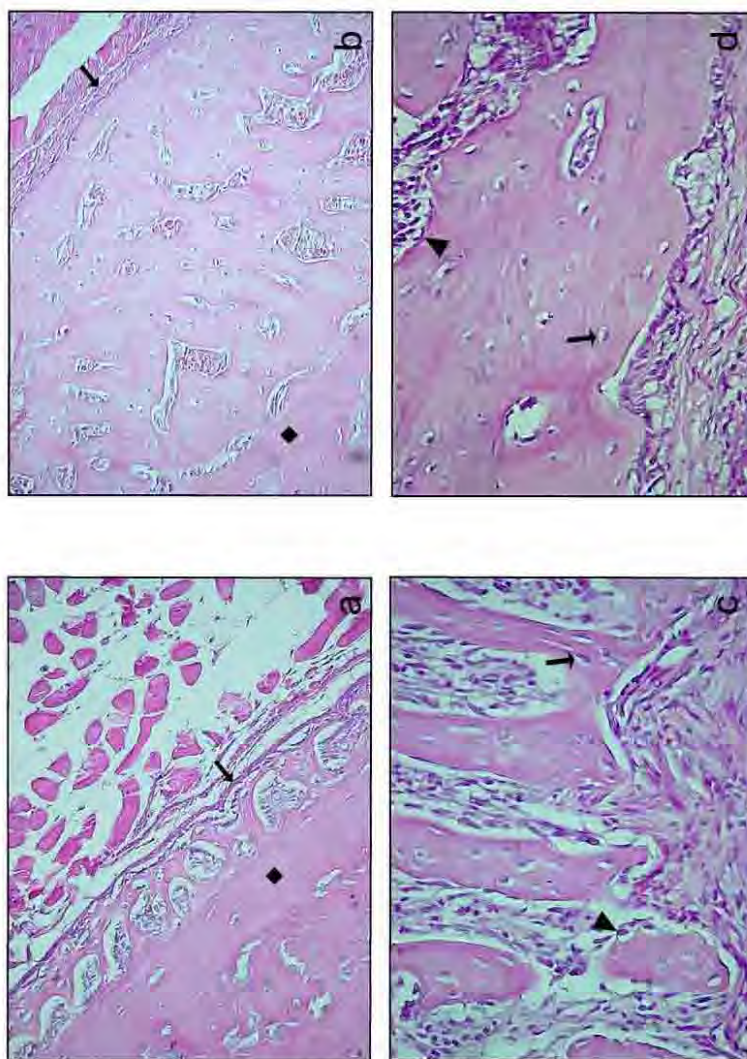
Figura 8 - SHR fêmeas, 21 dias (vista panorâmica): **a) grupo C:** defeito ósseo fechado em extensão; **b) grupo Am:** trabéculas ósseas anastomosadas fechando todo o defeito; **c) grupo A1:** tecido conjuntivo na área do defeito e neoformação óssea extra-cortical subperiosteal (→); **d) grupo A2:** tecido conjuntivo na área do defeito e neoformação óssea extra-cortical subperiosteal (→). HE. Aumento original de 25x.



grande quantidade, que se encontravam abrigados em lacunas de menores proporções quando comparado aos animais dos grupos de sete dias. Os espaços medulares contendo tecido conjuntivo frouxo e vasos sangüíneos também se mostravam reduzidos. O osso apresentava maior maturação, com características evidentes de remodelação óssea, devido à presença das linhas reversas basofílicas (Figura 10b).

FIGURA 9 - SHR fêmeas, 21 dias (centro do defeito): **a) grupo C:** trabéculas ósseas anastomosadas delimitando espaços medulares; **b) grupo Am:** defeito ósseo fechado por tecido ósseo neoformado, recoberto por tecido conjuntivo fibroso (→); **c) grupo A1:** tecido conjuntivo na área do defeito; **d) grupo A2:** defeito preenchido por tecido conjuntivo frouxo. HE. Aumento original de 100x.





**FIGURA 10** – Detalhes da neoformação óssea: **a)** formação de tecido ósseo extra-cortical superioosteal aos sete dias nos grupos tratados com alendronato. Observar as trabéculas ósseas recobertas por periosteó (→) e em contato direto com a cortical óssea externa (◆); **b)** tecido ósseo extra-cortical superioosteal aos 21 dias nos grupos tratados com alendronato. Tecido ósseo recoberto pelo periosteó (→) e em contato com a cortical óssea externa (◆); **c)** trabéculas ósseas imaturas, delimitando espaços medulares, observar os osteoblastos se incorporando ao tecido ósseo (▲) e osteócitos volumosos (→); **d)** tecido ósseo mais maduro e com arranjo lamelar, apresentando osteócitos menos volumosos (→) e osteoblastos achatados recobrimo a superfície óssea (▲). HE. Aumento original de 100x

## 5.2 Análise histomorfométrica

A análise quantitativa da neoformação óssea foi realizada por contagem total de pontos de intersecção do retículo sobre as trabéculas ósseas neoformadas (P), correspondendo à análise de seis cortes para cada animal estudado. Os resultados foram relatados em números absolutos (P) e em média percentual (P/600). A análise histomorfométrica será apresentada por grupos de acordo com o sexo dos animais e os períodos de observação.

A Tabela 1 apresenta os dados obtidos no grupo controle (C), aos sete dias, em machos e fêmeas.

Tabela 1 - Resultado da contagem total de pontos (P) e valor em média percentual\* do grupo C no período de sete dias, macho e fêmea

Grupo	Período 7 dias			
	Macho		Fêmea	
	P	Média	P	Média
C	35	0,0583	1	0,0017
C	10	0,0167	0	0,0
C	110	0,1833	15	0,0250
C	16	0,0267	65	0,0184
C	4	0,0067	9	0,0150

\*média percentual=P/600

As Tabelas 2 a 4 apresentam os dados obtidos aos sete dias, nos animais machos e fêmeas, dos grupo amido (Am), alendronato 1mol (A2) e alendronato 2mol (A2), respectivamente.

Tabela 2 - Resultado da contagem total de pontos (P) e valor em média percentual\* do grupo Am no período de sete dias, macho e fêmea

Grupo	Período 7 dias			
	Macho		Fêmea	
	P	Média	P	Média
Am	8	0,0133	13	0,0216
Am	10	0,0167	0,0	0,0
Am	12	0,0200	10	0,0167
Am	0,0	0,0	0,0	0,0
Am	61	0,1017	3	0,005

\*média percentual=P/600

Tabela 3 - Resultado da contagem total de pontos (P) e valor em média percentual\* do grupo A1 no período de sete dias, macho e fêmea

Grupo	Período 7 dias			
	Macho		Fêmea	
	P	Média	P	Média
A1	0,0	0,0	0,0	0,0
A1	0,0	0,0	0,0	0,0
A1	0,0	0,0	0,0	0,0
A1	0,0	0,0	0,0	0,0
A1	0,0	0,0	0,0	0,0

\*média percentual=P/600



Tabela 4 - Resultado da contagem total de pontos (P) e valor em média percentual\* do grupo A2 no período de sete dias, macho e fêmea

Grupo	Período 7 dias			
	Macho		Fêmea	
	P	Média	P	Média
A2	0,0	0,0	0,0	0,0
A2	0,0	0,0	0,0	0,0
A2	0,0	0,0	3	0,0075
A2	0,0	0,0	10	0,0167
A2	0,0	0,0	18	0,0300

\*média percentual=P/600

As Tabelas 5 a 8 apresentam os dados obtidos aos 21 dias, nos animais machos e fêmeas, dos grupos controle (C), amido (Am), alendronato 1mol (A1) e alendronato 2mol (A2), respectivamente.

Tabela 5 - Resultado da contagem total de pontos (P) e valor em média percentual\* do grupo C no período de 21 dias, macho e fêmea

Grupo	Período 21 dias			
	Macho		Fêmea	
	P	Média	P	Média
C	126	0,21	104	0,1733
C	151	0,2516	133	0,2217
C	164	0,2733	158	0,2633
C	183	0,305	159	0,265
C	162	0,27	243	0,405

\*média percentual=P/600

Tabela 6 - Resultado da contagem total de pontos (P) e valor em média percentual\* do grupo Am no período de 21 dias, macho e fêmea

Grupo	Período 21 dias			
	Macho		Fêmea	
	P	Média	P	Média
Am	79	0,1320	189	0,315
Am	104	0,1733	252	0,420
Am	84	0,1400	250	0,4167
Am	172	0,2867	250	0,4167
Am	158	0,2633	240	0,40

\*média percentual=P/600

Tabela 7 - Resultado da contagem total de pontos (P) e valor em média percentual\* do grupo A1 no período de 21 dias, macho e fêmea

Grupo	Período 21 dias			
	Macho		Fêmea	
	P	Média	P	Média
A1	10	0,0167	0,0	0,0
A1	133	0,2217	11	0,0183
A1	94	0,1567	14	0,0233
A1	57	0,0950	11	0,0183
A1	120	0,20	3	0,0050

\*média percentual=P/600

Tabela 8 - Resultado da contagem total de pontos (P) e valor em média percentual\* do grupo C no período de 21 dias, macho e fêmea

Grupo	Período (21 dias)			
	Macho		Fêmea	
	P	%	P	%
A2	2	0,0033	67	0,1117
A2	0	0	36	0,06
A2	16	0,0267	29	0,0483
A2	0	0,0	36	0,06
A2	15	0,025	0	0,0

\*média percentual=P/600

### 5.3 Análise estatística

Os dados obtidos a partir da análise histomorfométrica foram submetidos à análise estatística descritiva, destacando o valor percentual médio de neoformação óssea e o desvio padrão para cada grupo experimental. Três fatores foram considerados na análise de variância (ANOVA): o tratamento realizado em cada grupo experimental (C, Am, A1 e A2), o sexo dos animais (macho e fêmea) e o período de observação (sete e 21 dias).

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados da estatística descritiva, obtidos com relação aos diferentes grupos experimentais, no período de sete dias, nos SHR machos.

Tabela 9 - Estatística descritiva referente aos grupos experimentais, no período de sete dias, SHR machos

Grupo	Período 7 dias (machos)	
	Média	DP
C	0,0583	0,0725
Am	0,0303	0,0406
A1	0,0	0,0
A2	0,0	0,0

DP: desvio padrão

Na Tabela 10, encontram-se relatados os resultados da estatística descritiva realizada em todos os grupos experimentais, no período de sete dias, nos SHR fêmeas

Tabela 10 - Estatística descritiva referente aos grupos experimentais, no período sete dias, SHR fêmeas

Grupo	Período 7 dias (fêmeas)	
	Média	DP
C	0,03	0,045
Am	0,0087	0,01
A1	0,0	0,0
A2	0,0108	0,0127

DP: desvio padrão

Nas Tabela 11 e 12 encontram-se os resultados da estatística descritiva realizada em todos os grupos experimentais, no período de 21 dias, nos SHR machos e fêmeas, respectivamente.

Tabela 11 - Estatística descritiva referente aos grupos experimentais, no período 21 dias, SHR machos

Grupo	Período 21 dias (machos)	
	Média	DP
C	0,2620	0,0348
Am	0,1992	0,0717
A1	0,138	0,0833
A2	0,011	0,0136

DP: desvio padrão

Tabela 12 - Estatística descritiva referente aos grupos experimentais, no período 21 dias, SHR fêmeas

Grupo	Período 21 dias (fêmeas)	
	Média	DP
C	0,2655	0,0864
Am	0,3937	0,0447
A1	0,013	0,0099
A2	0,056	0,0398

DP: desvio padrão

O gráfico ilustrado na Figura 11 refere-se aos valores das médias percentuais e DP dos dados da neoformação óssea nos diferentes grupos experimentais (C, Am, A1 e A2), aos sete e 21 dias, nos SHR machos e fêmeas.

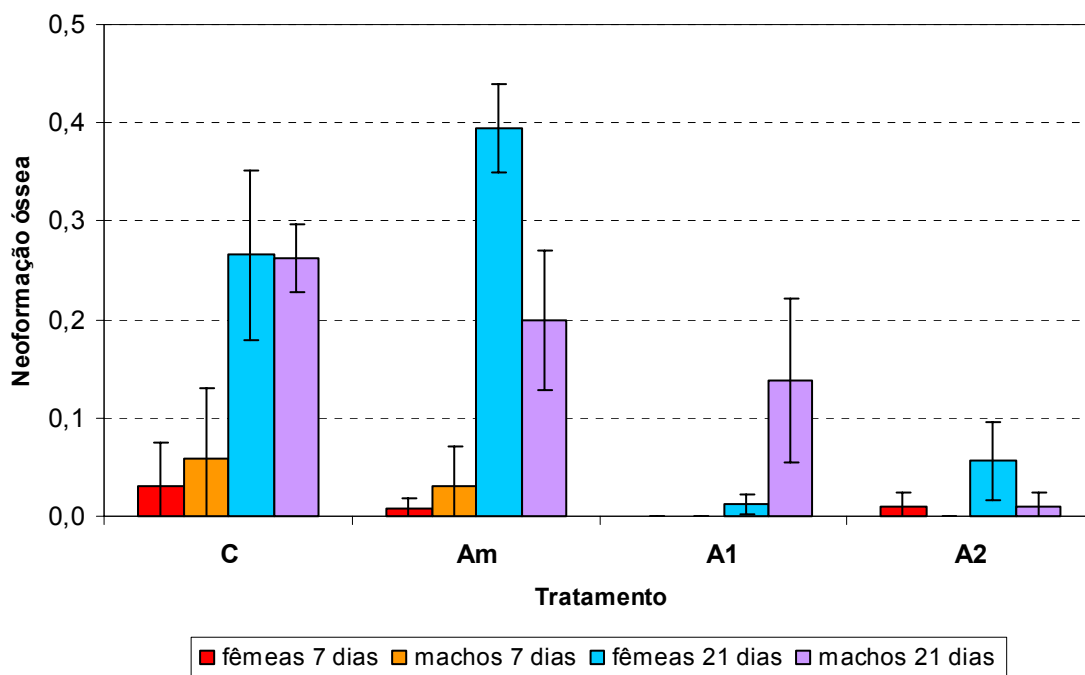


Figura 11 - Gráfico ilustrativo das médias e DP dos dados da neoformação óssea nos diferentes grupos experimentais, aos sete e 21 dias, nos SHR machos e fêmeas

De acordo com a Figura 11, constatou-se que os valores das médias de neoformação óssea foram maiores nos grupos de 21 dias de observação. Nos grupos C, Am e A2 observou-se que as fêmeas apresentaram médias de neoformação óssea maiores que os machos, que somente superaram as fêmeas no grupo A1.

Na Tabela 13 estão apresentados os resultados estatísticos da ANOVA (nível de significância 5%) com relação aos fatores estudados, bem como em relação à interação entre estes fatores.

Tabela 13 - Análise de variância a três fatores

Fatores	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	P
Grupo experimental	0,3278	3	0,1093	51,71	<b>0,000*</b>
Período	0,4501	1	0,4501	212,9	<b>0,000*</b>
Sexo	0,0019	1	0,0019	0,92	0,341
Interação grupo x período	0,2068	3	0,0689	32,62	<b>0,000*</b>
Interação grupo x sexo	0,0596	3	0,0198	9,4	<b>0,000*</b>
Interação período x sexo	0,0077	1	0,0077	3,64	0,061
Interação grupo x período x sexo	0,0729	3	0,0243	11,5	<b>0,000*</b>
Resíduo	0,1352	64	0,0021		
<b>Total</b>	<b>1,2623</b>	<b>79</b>			

\*  $P < 0,05$  = diferença estatisticamente significativa

Analisando os dados obtidos na Tabela 13, observamos que houve diferença estatisticamente significativa com relação aos seguintes fatores estudados: grupos experimentais; períodos de observação; interação grupos experimentais e períodos de observação; interação grupos experimentais e sexo dos animais; interação grupos experimentais, períodos de observação e sexo dos animais.

Esses resultados tornaram necessária a aplicação do teste de comparação múltipla de Tukey para a comparação entre os valores encontrados.

Tabela 14 - Formação de grupos homogêneos após o Teste de Tukey (5%) para as variáveis grupos experimentais, períodos de observação e sexo dos animais, em relação à média de neoformação óssea

Grupo experimental	Período de observação	Sexo	Média	Grupos homogêneos	
A1	7 dias	Machos	0,00	a	
A2	7 dias	Machos	0,00	a	
A1	7 dias	Fêmeas	0,00	a	
Am	7 dias	Fêmeas	0,0086	a	
A2	7 dias	Fêmeas	0,0108	a	
A2	21 dias	Machos	0,011	a	
A1	21 dias	Fêmeas	0,0129	a	
C	7 dias	Fêmeas	0,03	a	
Am	7 dias	Machos	0,0303	a	
A2	21 dias	Fêmeas	0,056	a	b
C	7 dias	Machos	0,0582	a	b
A1	21 dias	Machos	0,138	b	c
Am	21 dias	Machos	0,1992	c	d
C	21 dias	Machos	0,262		d
C	21 dias	Fêmeas	0,2654		d
Am	21 dias	Fêmeas	0,3936		e

\* grupos com letras iguais não diferem estatisticamente a 5%



De maneira geral, os resultados dispostos na Tabela 14 demonstraram que os animais dos grupos C e Am exibiram maior formação óssea aos 21 dias.

Aos sete dias, apenas o grupo C de animais machos apresentou maior formação óssea. Entre os demais grupos, não houve diferença estatística.

Nos animais machos aos 21 dias, as médias de neoformação óssea mostraram-se mais baixas, com diferença estatisticamente significativa, no grupo tratado com 2mol de alendronato sódico (A2). O grupo A1 de animais machos, aos 21 dias, foi o único grupo que demonstrou maior formação óssea com resultado mais próximo aos grupos C e Am, no mesmo período de observação.

Já nos animais fêmeas, aos 21 dias, ambos os grupos A1 e A2 mostraram menor neoformação óssea, com os valores das médias diferindo estatisticamente dos grupos C e Am.

## 6 DISCUSSÃO

A HAS consiste numa doença relacionada a alterações ósseas importantes, que pode originar principalmente a diminuição da densidade mineral óssea (IZAWA et al.<sup>28</sup>, 1985; INOUE et al.<sup>26</sup>, 1995; CAPPUCCIO et al.<sup>10</sup>, 1999; NICHOLS et al.<sup>46</sup>, 2003; PÉREZ-CASTRILLÓN et al.<sup>52</sup>, 2003). Alguns autores sugerem que existe uma relação entre as alterações dos fatores de regulação do cálcio e a tendência à perda óssea nos indivíduos hipertensos (JORDE et al.<sup>32</sup>, 2000; TSUDA et al.<sup>72</sup>, 2001; MUSSOLINO et al.<sup>43</sup>, 2003).

As principais alterações no metabolismo do cálcio evidenciadas na HAS consistem na elevação dos níveis do PTH sérico, no aumento do cálcio sérico ionizado, na diminuição do conteúdo de cálcio ósseo e no aumento da excreção urinária do cálcio (McCARRON et al.<sup>41</sup>, 1981; BRICKMAN et al.<sup>7</sup> 1990; JORDE et al.<sup>32</sup>, 2000).

O metabolismo do tecido ósseo de indivíduos hipertensos tem como importante fator o PTH, uma vez que estes apresentam níveis mais elevados do hormônio circulando no sangue. O PTH estimula a atividade osteoclástica e mobiliza o cálcio presente no esqueleto, podendo levar a uma diminuição da densidade mineral óssea (JESPERSEN<sup>30</sup>, 1997).

Apesar dos estudos demonstrarem que a HAS origina alterações evidentes no tecido ósseo dos indivíduos, influenciando na evolução de diversas patologias, pouco se conhece a respeito da influência dessa doença nos processos de reparação óssea. Em 2004, o estudo de Pereira<sup>51</sup> constatou que os ratos tipo SHR apresentavam uma

neoformação óssea mais avançada, com diferença estatisticamente significativa em relação aos normotensos.

Os ratos tipo SHR consistem num bom modelo de estudo da hipertensão experimental, uma vez que reproduzem a doença com muita similaridade com aquela apresentada por humanos (McCARRON et al.<sup>41</sup>, 1981; BARBAGALLO et al.<sup>3</sup>, 1991; WANG et al.<sup>75</sup>, 1993). As pesquisas comprovam que a hipertensão arterial presente nesses animais também está relacionada a anormalidades no metabolismo do cálcio, o que resulta em modificações importantes no tecido ósseo (YAMORI et al.<sup>83</sup>, 1991; WANG et al.<sup>75</sup>, 1993; WRIGHT & DeMOSS<sup>79</sup>, 2000). São considerados animais osteopênicos, por apresentarem alta taxa de remodelação do esqueleto (BARBAGALLO et al.<sup>3</sup>, 1991; WRIGHT & DeMOSS<sup>79</sup>, 2000).

Sabe-se que o mecanismo de redução da massa óssea nos ratos tipo SHR ocorre devido ao desequilíbrio da relação existente entre as atividades osteoclástica e osteoblástica, caracterizando-se por um aumento da reabsorção e na diminuição da massa óssea (WANG et al.<sup>75</sup>, 1993).

Os SHR caracterizam-se por apresentarem menor peso corpóreo quando comparados aos ratos normotensos, com relatos de menor comprimento e volume de osso (IZAWA et al.<sup>28</sup>, 1985, INOUE et al.<sup>26</sup> 1995). Izawa et al.<sup>28</sup> (1985) verificaram que o tecido ósseo dos SHR apresentou menor área cortical quando comparado ao osso dos ratos normotensos. Quanto ao osso esponjoso, autores como Yamori et al.<sup>83</sup> (1991) e Wang et al.<sup>75</sup> (1993) relatam que esses animais apresentam uma diminuição do volume e da espessura do osso trabecular.

Inoue et al.<sup>26</sup> (1995) através de análise histométrica, observaram que o volume e a espessura do osso trabecular foram semelhantes entre os ratos SHR e SD. No entanto, observaram que a DMO dos SHR demonstrou ser reduzida, sugerindo uma menor quantidade mineral no tecido ósseo dos ratos SHR.

A DMO alterada também foi evidenciada por Barbagallo et al.<sup>3</sup> (1991) que encontraram valores diminuídos nos SHR, sendo este fato também observado em humanos por Cappuccio et al.<sup>10</sup> (1999) e Tsuda et al.<sup>72</sup> (2001).

Barbagallo et al.<sup>3</sup> (1991) demonstraram que os ratos tipo SHR, além de apresentarem DMO reduzida, apresentavam baixos níveis de cálcio ósseo. No entanto, Wright & DeMoss<sup>79</sup> (2000) não observaram alteração no conteúdo desse elemento no esqueleto.

Níveis séricos elevados do PTH têm sido observados nos ratos tipo SHR, caracterizando o predomínio do processo de reabsorção óssea sobre a formação óssea nesses animais. A presença do PTH mobiliza o cálcio presente no tecido ósseo, levando à elevação das taxas de cálcio sérico, além de resultar num quadro de hipercalcúria (YAMORI et al.<sup>83</sup>, 1991). Wang et al.<sup>75</sup> (1993) justificam a diminuição do volume trabecular nos SHR devido aos altos níveis de PTH no soro.

Neste estudo observamos que os SHR mostraram reparação óssea mais retardada quando comparado ao estudo de Pereira<sup>51</sup> (2005) realizado em ratos SHR e ao estudo de Fernandes<sup>17</sup> (2005) com ratos normotensos WKY.

A análise histológica deste trabalho mostrou resultados que diferiram daquele encontrado por Pereira<sup>51</sup> (2004). O autor observou que aos sete dias, os ratos tipo SHR apresentavam a formação de trabéculas ósseas imaturas na maioria dos espécimes estudados.

Neste estudo, no período de sete dias, a maioria dos grupos experimentais ainda apresentava um tecido conjuntivo frouxo com focos de hemorragia na área do defeito ósseo, sugerindo que a fase de substituição do hematoma por tecido de granulação ainda não havia se completado. Ainda no período de sete dias, alguns espécimes dos grupos C e Am apresentavam tecido osteóide em meio ao tecido conjuntivo, caracterizando a formação óssea imatura presente na primeira semana do experimento.

A avaliação histomorfológica realizada nos grupos C e Am, aos 21 dias, mostrou o fechamento de toda a extensão do defeito ósseo na maioria dos espécimes, com a presença de um tecido ósseo neoformado que se continuava com o tecido cortical adjacente. Nesses espécimes, observou-se a presença de trabéculas ósseas dispostas irregularmente em meio a um tecido conjuntivo frouxo e bastante celularizado. Observou-se em alguns casos, a presença de linhas reversas basofílicas, que sugere a ocorrência de um processo de remodelação óssea.

Ainda no período de 21 dias, pudemos constatar que as trabéculas ósseas se anastomosavam e encontravam-se circundadas por osteoblastos achatados, semelhante ao que foi encontrado por Pereira<sup>51</sup> (2004) em seu estudo.

Alguns autores relatam características ósseas distintas entre os animais tipo SHR machos e fêmeas. Os estudos mostram que os SHR fêmeas apresentam peso corpóreo, comprimento e volume ósseos reduzidos (INOUE et al.<sup>26</sup>, 1995) e taxas de reabsorções ósseas mais elevadas (WRIGHT & DeMOSS<sup>79</sup>, 2000). No entanto, Pereira<sup>51</sup> (2004) observou que o processo de reparo ósseo nos ratos normotensos e hipertensos não apresentou diferenças entre os sexos.

Neste estudo não se observou diferença estatística entre os sexos dos animais, mas apenas quando se avaliou a interação do sexo com os outros fatores estudados.

Uma vez que se reconhecem as alterações ósseas presentes em indivíduos com hipertensão arterial, utilizou-se neste estudo o alendronato sódico como medicamento no local do defeito ósseo, a fim de observar seus efeitos na reparação óssea em ratos tipo SHR.

Por apresentar grande afinidade pela matriz óssea e capacidade de inibir sua reabsorção, o alendronato sódico é amplamente utilizado no tratamento de desordens relacionadas ao tecido ósseo, como é o caso da osteoporose (FLEISCH<sup>19</sup>, 1997; CASTRO et al.<sup>11</sup>, 2004).

O mecanismo molecular pelo qual os bisfosfonatos inibem a reabsorção óssea ainda não é completamente entendido. Sabe-se que está relacionado com a inibição dos osteoclastos nas lacunas de reabsorção. Uma vez que essas células produzem endocitose, os bisfosfonatos presentes no local penetram nos osteoclastos, afetando seu metabolismo intracelular e induzindo a apoptose. Através de uma ação indireta, os bisfosfonatos também atuam estimulando os osteoblastos a produzirem mediadores químicos que inibem o recrutamento dos osteoclastos. Tudo isso contribui para um aumento da densidade mineral óssea (SATO et al.<sup>61</sup>, 1991; ROGERS et al.<sup>59</sup>, 1999; NEVES et al.<sup>45</sup>, 2002).

Os bisfosfonatos apresentam baixa absorção intestinal em humanos, uma vez que estes fármacos são pouco lipofílicos, dificultando o transporte através da barreira epitelial. Quando administrados por via endovenosa, desaparecem do plasma rapidamente com uma meia-vida de uma a duas horas. Por outro lado, sabe-se que uma vez ligados ao osso, os bisfosfonatos só são liberados quando o tecido sofre reabsorção (FLEISCH<sup>19</sup>, 1997; KULAK & BILEZIKIAN<sup>35</sup>, 2000).

Nos últimos dez anos, têm-se estudado o uso do alendronato sódico com o objetivo de inibir os processos de reabsorção óssea decorrentes de procedimentos cirúrgicos e melhorar a reparação tecidual, com destaque para a reparação do tecido ósseo.

Sua utilização sistêmica foi bastante estudada em processos de reabsorção óssea decorrentes de doença periodontal e de procedimentos cirúrgicos. Autores como Weinreb et al.<sup>76</sup> (1994), Reddy et al.<sup>55</sup> (1995) e Altundal & Güvener<sup>2</sup> (2004) observaram que a administração do alendronato sódico resultou em menor reabsorção óssea alveolar nos animais tratados, mostrado em alguns casos uma redução significativa dos níveis de cálcio sérico e urinário, além de um menor número de osteoclastos no tecido ósseo.

Vários estudos também empregaram os bisfosfonatos por via sistêmica para avaliar os processos de reparação óssea. Em 2000, Silva<sup>64</sup> administrou o alendronato sódico por via oral, na água de beber e avaliou a sua ação no reparo de tíbias de ratas ovariectomizadas. A análise histológica demonstrou maior formação óssea nos animais tratados com as maiores doses do medicamento. O grupo de 14 dias, sob a dose de 0,5mg/kg, apresentou a formação de osso trabecular mais maduro e organizado. O autor sugere que a ação do alendronato sódico possa ser dose-dependente.

Já Fayad<sup>14</sup> (2001) demonstrou em sua pesquisa que nenhum dos bisfosfonatos, dentre eles o alendronato sódico, contribuiu para a reparação óssea em defeitos confeccionados na mandíbula de ratos. Os medicamentos foram administrados por via oral antes e após a cirurgia, todos na dose de 1mg/kg. Fernandes<sup>16</sup> (2002) estudou a reparação óssea em coelhos e utilizou o alendronato sódico por via oral, também na dose de 1mg/Kg. Seus resultados mostraram que o uso do alendronato sódico e sua associação com a hidroxiapatita não interferiram na reparação óssea nesse modelo experimental.

Considerando as suas propriedades farmacocinéticas, a administração local dos bisfosfonatos parece ser mais efetiva (MERAW et al.<sup>42</sup>, 1999; YAFFE et al.<sup>82</sup>, 2000; SHIBATA et al.<sup>63</sup>, 2004). No entanto, a forma de administração e a dose dos fármacos ainda são fatores importantes a serem elucidados, uma vez que existem muitas controvérsias a respeito de seu mecanismo de ação, principalmente nos processos de reparação óssea.

O primeiro estudo que revelou a ação local positiva do alendronato sódico sobre a reabsorção do tecido ósseo foi realizado por Yaffe et al.<sup>81</sup> (1997). Os autores utilizaram uma membrana embebida em 0,025ml de alendronato sódico sobre o tecido ósseo de ratos exposto após a confecção de retalhos mucoperiosteais em cirurgia periodontal. Os resultados demonstraram uma redução significativa da perda óssea

alveolar em comparação ao grupo controle. Uma ação positiva também foi observada por Binderman et al.<sup>4</sup> (2000), em estudo semelhante ao anterior, no qual utilizaram uma membrana embebida em diferentes doses de alendronato sódico. Neste caso, a redução da reabsorção óssea alveolar foi evidenciada após o emprego das concentrações mais altas do fármaco (200 e 400µg).

Um segundo experimento realizado por Binderman et al.<sup>4</sup> (2000) demonstrou que a aplicação à distância do sítio cirúrgico de 400µg/ml de alendronato também diminuiu a reabsorção alveolar, sugerindo uma ação sistêmica favorável do fármaco.

Kawata et al.<sup>34</sup> (2004) demonstraram redução significativa da reabsorção do tecido ósseo nas formas de administração local e sistêmica de solução de alendronato sódico na concentração de  $10^{-4}$ mol. Os autores observaram que a ação local do medicamento diminuiu a reabsorção de enxertos ósseos inseridos no subcutâneo de camundongos. Também observaram que a injeção intraperitoneal do medicamento reduziu o número de osteoclastos após nove semanas da cirurgia.

Em 1999, o estudo de Meraw et al.<sup>42</sup> demonstrou a contribuição positiva do alendronato sódico para a regeneração do tecido ósseo após a realização de implantes osseointegráveis.

A aplicação local do alendronato sódico na forma de gel tem sido estudado recentemente, principalmente na cicatrização dos tecidos do periodonto. Matsura<sup>40</sup> (2003) utilizou gel de alendronato sódico no tratamento de defeitos periodontais infra-ósseos de humanos observou que o tratamento não contribuiu para o ganho de inserção clínica dos tecidos periodontais, tampouco provocou alterações significativas no tecido ósseo. Já, Reddy et al.<sup>54</sup> (2004), em estudo semelhante, observaram que o gel de alendronato sódico contribuiu para uma melhora significativa nos parâmetros clínicos periodontais, bem como para a



formação óssea local, com redução das perdas ósseas relacionadas à doença.

Além de contribuir para a reparação dos tecidos periodontais, o alendronato sódico também pode diminuir a formação de tecido mineralizado no periodonto (Shibata et al.<sup>63</sup>, 2004), mantendo as propriedades biológicas do ligamento periodontal.

São poucos os estudos que empregam localmente o alendronato sódico para avaliar os processos de reparação óssea. Jaime et al.<sup>29</sup> (2005) demonstraram que o medicamento não contribuiu para a reparação óssea, quando administrado localmente no defeito ósseo da calvária de ratas ovariectomizadas.

Fernandes<sup>17</sup> (2005) também não observou ação positiva do medicamento na reparação óssea em fêmures de ratos. O autor estudou a ação local do alendronato sódico, da hidroxiapatita e da associação do alendronato com a hidroxiapatita, no reparo ósseo de defeitos medindo 2,5mm de diâmetro. O sal de alendronato sódico foi administrado localmente sobre duas concentrações diferentes (1mol e 2mol). Os resultados demonstraram que os todos os grupos sacrificados após sete dias do procedimento cirúrgico, apresentaram formação óssea com trabéculas imaturas, exceto nos animais machos nos quais o alendronato foi utilizado. Aos 21 dias, o tecido ósseo neoformado fechava o defeito na maioria dos espécimes estudados. Depois de realizada a análise histomorfométrica, o autor concluiu que a reparação óssea foi maior nas fêmeas do que nos machos, independente do período estudado. Entretanto, observou-se que a aplicação local do alendronato sódico, associado ou não à hidroxiapatita, administrado na forma de concentração molar, não contribuiu para a reparação óssea nesse modelo experimental.

Neste estudo, observamos que o grupo experimental tratado com alendronato 2mol (A2) mostrou menor formação óssea ao final dos 21 dias, quando comparado ao grupo tratado com alendronato

1mol (A1), com diferença estatisticamente significativa nos SHR machos. Esse dado pode ser explicado pelo fato do alendronato sódico apresentar efeitos citotóxicos quando administrado em concentrações mais elevadas.

Além disso, nossos resultados demonstram que os animais de ambos os grupos A1 e A2 apresentaram menor neoformação óssea quando comparados àqueles dos grupos C e Am, independente do sexo ou período de observação. Dados semelhantes foram observados por Fernandes<sup>17</sup> (2005), que mostrou a influência do alendronato sódico retardando o processo de reparação óssea.

Nos grupos A1 aos 21 dias, a análise histológica demonstrou a presença de trabéculas ósseas imaturas, interpostas por tecido conjuntivo frouxo nos animais machos, que se irradiavam do interior do canal medular do fêmur até a área do defeito. Este achado não foi observado nas fêmeas, que apresentavam na área do defeito ósseo apenas a presença de tecido conjuntivo denso, com deposição de feixes de fibras colágenas e, em alguns casos, a deposição de matriz osteóide.

Apesar de poucos ensaios clínicos comprovarem a ação anabólica do alendronato sódico sobre o tecido ósseo, estudos realizados *in vitro* demonstram sua atividade estimulando a neoformação óssea.

Giuliani et al.<sup>23</sup> (1998) observaram que o alendronato sódico estimulou a formação de CFU-F e de CFU-OB da medula óssea de ratos, quando administrado em baixas concentrações e inibiu o processo em concentrações maiores. No caso das culturas de células da medula óssea humana, o alendronato aumentou a formação de CFU-F e de CFU-OB, havendo o efeito máximo do fármaco na concentração de  $10^{-10}$  mol/L. Im et al.<sup>27</sup> (2004) demonstraram que o emprego do alendronato sobre a cultura de células osteoblásticas, estimulou a proliferação celular, com níveis máximos na concentração de  $10^{-8}$  mol.

Os estudos têm demonstrado que os bisfosfonatos apresentam uma ação bifásica, estimulando a proliferação celular e formação de tecido osteóide nas concentrações mais baixas e inibindo

esse processo em maiores concentrações. (WEINREB et al.<sup>76</sup>, 1994; GIULIANI et al.<sup>23</sup>, 1999; REINHOLZ et al.<sup>56</sup>, 2000; IM et al.<sup>25</sup>, 2004; CORREIA<sup>12</sup>, 2005). As concentrações mais elevadas do fármaco parecem influenciar na viabilidade das células, prejudicando suas funções metabólicas.

García-Moreno et al.<sup>21</sup> (1998) comprovaram em estudo *in vitro* que as concentrações mais elevadas de alendronato sódico (igual ou maior que  $10^{-4}$ mol/L) interferiram na viabilidade das células osteoblásticas, prejudicando a sua capacidade proliferativa. Correia (2005) demonstrou ação semelhante do medicamento sobre fibroblastos do ligamento periodontal de humanos em cultura celular. O autor observou que as maiores concentrações da droga ( $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  mol) afetaram a viabilidade celular, sendo o alendronato sódico considerado citotóxico nesses casos.

Acreditamos que a concentração molar empregada possa ter afetado a viabilidade das células osteoblásticas e, por isso, ter desempenhado uma ação tecidual citotóxica, que interferiu na reparação óssea nos grupos A1 e A2. As análises histológicas comprovaram essa ação, pois ficou evidente a presença de um tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório, associado freqüentemente a uma rede de fibrina nas áreas do defeito ósseo dos grupos A1 e A2, aos sete dias. No período de 21 dias, não se observava neoformação óssea com o fechamento do defeito ósseo. Esta quando presente mostrava-se com trabéculas ósseas imaturas, diferente do que foi observado nos grupos C e Am.

No entanto, a análise histomorfológica nos levou a um achado interessante que foi a formação de tecido ósseo extra-cortical subperiosteal, em todos os grupos experimentais tratados com alendronato 1mol e 2mol. Este fato foi mais marcante nos animais SHR fêmeas do grupo A2, aos 21 dias do experimento.

O tecido ósseo extra-cortical presente sob o perióstio, encontrava-se no lado oposto ao defeito ósseo e apresentava características de um tecido maduro remodelado, com presença de linhas reversas basofílicas, espaços medulares aumentados, quando comparado a cortical óssea adjacente e com a presença de inúmeras lacunas ocupadas por osteócitos volumosos.

Essa característica também foi evidenciada por Fernandes<sup>17</sup> (2005) em ratos normotensos, em todos os grupos tratados com alendronato sódico. O autor acredita que este fenômeno possa ter sido desencadeado pela penetração do medicamento sob o perióstio, no momento da inserção do material. Além dessa ação local do medicamento, acreditamos que o alendronato, através da sua inserção no interior da medula óssea no momento da cirurgia, possa ter sido incorporado pelo tecido ósseo.

Mesmo tendo sido utilizado na sua forma pura, na apresentação de pó, o alendronato sódico não possui a natureza de um material de preenchimento, que desempenhe papel osteocondutor na reparação óssea. Suas propriedades físico-químicas demonstram que este medicamento é rapidamente reabsorvido quando não se deposita no tecido ósseo, fixando-se aos cristais de hidroxiapatita. No entanto, quando incorporado ao osso, este é liberado lentamente com o passar do tempo. Isso poderia estimular as células mesenquimais indiferenciadas presentes na medula óssea e as células quiescentes do endóstio e perióstio a produzirem tecido ósseo.

Com base nessa teoria, também tentamos justificar o padrão de formação óssea encontrado no grupo A1, de ratos machos ao final de 21 dias. Observava-se que a área do defeito ósseo não se encontrava totalmente fechada por tecido ósseo. Nesses animais, a formação do osso partia do interior da medula óssea, com trabéculas ósseas imaturas que se irradiavam da medula óssea à região do defeito

ósseo. Acreditamos que o alendronato sódico possa ter estimulado as células da medula e do endósteo, contribuindo para esse fenômeno.

Apesar dos resultados demonstrarem que a aplicação local do alendronato sódico não contribuiu para o processo de reparação óssea, sabe-se que variações na metodologia, como novas formas de administração e diferentes concentrações molares, podem dar resultados positivos. Portanto, acreditamos que se tornam necessários estudos mais aprofundados para avaliar a ação local do alendronato sódico sobre o processo de formação óssea.

## 7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

- a) a aplicação local do alendronato sódico não contribuiu para reparação óssea nos SHR;
- b) a reparação óssea entre os grupos experimentais foi maior no período de 21 dias quando comparada ao de sete dias, exceto no grupo A1 de animais fêmeas e nos grupos A2 de animais de ambos os sexos;
- c) com relação ao sexo dos animais não houve diferença estatisticamente significativa;
- d) possivelmente, o alendronato sódico contribuiu para a formação do tecido ósseo extra-cortical subperiosteal encontrado.

## 8 REFERÊNCIAS

- 1 ALENCAR, V.B.M. et al. Disodium clodronate prevents bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v.73, n.3, p.251-256, Mar. 2002.
- 2 ALTUNDAL, H.; GÜVENER, Ö. The effect of alendronate on resorption of the alveolar bone following tooth extraction. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.33, n.3, p.286-293, Apr. 2004.
- 3 BARBAGALLO, M. et al. Histological evidence of increased turnover in bone from spontaneously hypertensive rats. **Cardioscience**, v.2, n.1, p.15-17, Mar. 1991.
- 4 BINDERMAN, I.; ADUT, M.; YAFFE, A. Effectiveness of local delivery of alendronate in reducing alveolar bone loss following periodontal surgery in rats. **J Periodontol**, v.71, n.8, p.1236-1240, Aug. 2000.
- 5 BIOMEN, L.J.M.J. **History of bisphosphonates: Bisphosphonate on bone**. Amsterdam: Elsevier, 1995, p.11-124.
- 6 BRASIL. Ministério da Saúde. **Hipertensão arterial sistêmica (HAS) e Diabetes mellitus (DM): protocolo**. Brasília, 2001. 96p. (Caderno de atenção básica, 7).

- 7 BRICKMAN, A.S. et al. Calcitropic hormones, platelet calcium, and blood pressure in essential hypertension. **Hypertension**, v.16, n.5, p.515-522, Nov. 1990.
- 8 BUDAVARI, S. et al. **The Merck index**: an encyclopedia of chemicals, drugs & biologicals. Merck research laboratories. 12.ed. New Jersey: Whitehouse station, 1996, 2535p.
- 9 BURNIER, M.; BRUNNER, H.R. Angiotensin II receptor antagonists. **Lancet**, v.355, n.9204, p.637-645, Feb. 2000.
- 10 CAPPuccio, F.P. et al. High blood pressure and bone-mineral loss in elderly white women: a prospective study. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. **Lancet**, v.354, n.9183, p.971-975, Sep. 1999. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>. Acesso em: 15 mar. 2005.
- 11 CASTRO, L.F; SILVA, A.T.A.; CHUNG, M. Bisfosfonatos (BFs) como transportadores osteotrópicos no planejamento de fármacos dirigidos. **Quim Nova**, v.27, n.3, p.456-460, 2004.
- 12 CORREIA, V.F.P. **Avaliação in vitro da citotoxicidade do alendronato de sódio sobre fibroblastos de ligamento periodontal de humanos em cultura celular**. 2005. 115f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de São Paulo, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2005.
- 13 DOUGLAS, C.R. Fisiologia dos princípios hemodinâmicos e da pressão arterial. In:\_. **Tratado de fisiologia aplicado à saúde**. 5. ed. São Paulo: Robe editorial, 2002. Cap.41, p.713-735.



- 14 FAYAD, M.V.L. **Reparação óssea sob ação de duas formulações de bisfosfonatos: estudo comparativo radiográfico e histológico.** 2001. 102f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2001.
- 15 FERNANDES, C.; LEITE, R.S.; LANÇAS, F.M. Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. **Quim Nova**, v.28, n.2, p.274-280, 2005.
- 16 FERNANDES, R.G. **Estudo da reparação óssea na mandíbula de coelhos sob a ação do alendronato sódico e de sua associação com a hidroxiapatita.** 2002. 112f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2002.
- 17 FERNANDES, R.G. **Estudo da ação local do alendronato sódico, da hidroxiapatita e da associação do alendronato sódico com a hidroxiapatita, no reparo ósseo de fêmures de ratos.** 2005. 127f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2005.
- 18 FISHER, J. E. et al. Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.96, n.1, p.133-138, Jan. 1999.

- 19 FLEISCH, H. A. Bisphosphonates: preclinical aspects and use in osteoporosis. **Ann Med**, v.29, n.1, p.55-62, Feb. 1997.
- 20 FROST, H. M. Dynamics of bone remodeling. In:\_. **Bone biodynamics**. Boston: Ed. Little Brown, 1964. p.315-333.
- 21 GARCIA-MORENO, C. et al. Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts. **Bone**, v.22, n.3, p.233-239, Mar. 1998.
- 22 GAVRAS, I.; MANOLIS A.J.; GAVRAS, H. The alpha-adrenergic receptors in hypertension and heart failure: experimental and clinical studies. **J Hypertension**, v.19, p.2115-2124, Dec. 2001.
- 23 GIULIANI, N. et al. Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures in vitro and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo. **Bone**, v.22, n.5, p.455-461, May 1998.
- 24 GEDDES, A.D., et al. Bisphosphonates: structure-activity relationships and therapeutic implications. **Bone Miner Res**, v.8, p.265-306, 1994.
- 25 IM, G. I. et al. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. **Biomaterials**, v.25, n.18, p.4105-4115, Aug. 2004. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>. Acesso em: 4 maio 2005.
- 26 INOUE, T. et al. What is the difference of bone growth in SHR and SD rats? **Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl**, v.22, n.1, Suppl.1, p.242-243, Dec. 1995.

- 27 ISHIZUYA, T. et al. Parathyroid hormone exerts disparate effects on osteoblast differentiation depending on exposure time in rat osteoblastic cells. **J Clin Invest**, v.99, n.12, p.2961-2970, June 1997.
- 28 IZAWA, Y. et al. Bone disorders in spontaneously hypertensive rat. **Calcif Tissue Int**, v.37, n.6, p.605-607, Dec. 1985.
- 29 JAIME, A.P.G. et al. Influência da administração local de alendronato sódico no reparo ósseo em calvária de ratas ovariectomizadas. **Cienc Odontol Bras**, v.8, n.2, p.70-79, Abr./Jun. 2005.
- 30 JESPERSEN, B. Effects of PTH (1-34) on blood pressure, renal function, and hormones in essential hypertension. The altered pattern of reactivity may counteract raised blood pressure. **Am J Hypertens**, v.10, n.12, Pt.1, p.1356-1367, Dec. 1997.
- 31 JILKA, R.L. et al. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. **J Clin Invest**, v.104, n.4, p.439-446, Aug. 1999.
- 32 JORDE, R. et al. Relation between low calcium intake, parathyroid hormone, and blood pressure. **Hypertension**, v.35, n.5, p.1154-1159, May 2000. Disponível em: <http://www.hypertensionaha.org>. Acesso em: 21 jan 2006.
- 33 JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In:\_. **Histologia básica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004. Cap.8, p.136-53.

- 34 KAWATA, T. et al. Effect of alendronate on osteoclast differentiation and bone volume in transplanted bone. **Exp Anim**, v.53, n.1, p.47-51, Jan. 2004.
- 35 KULAK, C.; BILEZIKIAN, J. Bisfosfonatos: Características e utilização na osteoporose. In: BANDEIRA, F. **Osteoporose**. Belo Horizonte: Ed. Medsi, p.351-366; 2000.
- 36 LIN, J.H. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. **Bone**, v.18, n.2, p.75-85, Feb. 1996.
- 37 LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- 38 LOVDAHL, M.J.; PIETRZYK, D.J. Anion-exchange separation and determination of bisphosphonates and related analytes by post-column indirect fluorescence detection. **J Chromatogr A**, v.850, n.1, p.143-152, July 1999.
- 39 LUCAS, P.A. et al. Abnormal vitamin D metabolism, intestinal calcium transport, and bone calcium status in the spontaneously hypertensive rat compared with its genetic control. **J Clin Invest**, v.78, n.1, p. 221-227. July 1986.
- 40 MATSURA, E. **Análise clínica do efeito do gel de alendronato de sódio na reparação de defeitos infra-ósseos periodontais, em humanos**. 2003. 59f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de São Paulo, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003.

- 41 McCARRON, D.A. et al. Disturbances of calcium metabolism in the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v.3, n.3, Pt. 2, p. 162-167, May-June 1981.
- 42 MERAW, E.J.; REEVE, C.M.; WOLLAN, P.C. Use of alendronate in peri-implant defect regeneration. **J Periodontol**, v.70, n.2, p.151-158, Feb. 1999.
- 43 MUSSOLINO, M.E.; MADANS, J.H.; GILLUM R.F. Bone mineral density and stroke. **Stroke**, v.34, n.5, p.e20-e22, May 2003. Disponível em: <http://www.strokeaha.org>. Acesso em: 11 nov 2004.
- 44 NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, **The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure**, NIH Publication, Aug. 2004, 104f. Disponível em: <http://www.nhlbi.nih.gov/>. Acesso em: 21 mar 2005.
- 45 NEVES, M. et al. Synthesis, characterization and biodistribution of bisphosphonates Sm-153 complexes: correlation with molecular modeling interaction studies. **Nucl Med Biol**, v.29, n.3, p.329-338, Apr. 2002.
- 46 NICHOLS, D.L. et al. Is there an association between high blood pressure and bone mineral density. **Med Sci Sports Exerc**, v.35, n.5, p. S78, May 2003.
- 47 NOBRE, F; LIMA, N.K.C. Hipertensão arterial: Conceito, classificação e critérios diagnósticos. In: **Manual de Cardiologia SOCESP**. São Paulo: Atheneu, 2000. Cap. 70; p. 303.

- 48 ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Rede interagencial de informações para a saúde. **Indicadores básicos para a saúde no Brasil: conceitos e aplicações** / Rede interagencial de informações para a saúde, Ripsa. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2002, p.299. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>. Acesso em: 7 abr 2005.
- 49 OSHIMA, T.; YOUNG, E. W. Systemic and cellular calcium metabolism and hypertension. **Semin Nephrol**, v.15, n.6, p.496-503, Nov. 1995.
- 50 PACKER, C.S. Angiotensin II as a multifunctional hormone: a regulator of haemodynamics and metabolism with potential roles in the etiologies of hypertension and the metabolic syndrome. **J Hypertens**, v.24, n.1, p.37-38, Jan. 2006.
- 51 PEREIRA, A.C. **Estudo comparativo do processo de reparação óssea em ratos normotensos e hipertensos (SHR)**. 2004. 90f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2004.
- 52 PÉREZ-CASTRILLÓN, J.L. et al. Bone mass and bone modeling markers in hypertensive postmenopausal women. **J Hum Hypertens**, v.17, n.2, p.107-110, Feb. 2003. Disponível em: <http://www.nature.com/jhh/index.html>. Acesso em: 15 mar 2005.

- 53 PÉREZ-CASTRILLÓN, J.L. et al. Relationship between bone mineral density and angiotensin converting enzyme polymorphism in hypertensive postmenopausal women. **Am J Hypertens**, v.16, n.3, p.233-235, Mar. 2003.
- 54 REDDY, G.I.; KUMAR, T.M; VEENA, K.M. Formulation and evaluation of alendronate sodium gel for the treatment of bone resorptive lesions in periodontitis. **Drug Deliv**, v.12, n.4, p.217-222, July-Aug. 2005.
- 55 REDDY, M.S. et al. Alendronate treatment of naturally-occurring periodontitis in beagle dogs. **J Periodontol**, v.66, n.3, p.211-217, Mar. 1995.
- 56 REINHOLZ, G.G. et al. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. **Cancer Res**, v.60, n.21, p.6001-6007, Nov. 2000.
- 57 ROCHA, M. et al. Clinical and radiological improvement of periodontal disease in patients with type 2 diabetes mellitus treated with alendronate: a randomized placebo-controlled trial. **J Periodontol**, v.72, n.2, p.204-209, Feb. 2001.
- 58 RODAN, G.A.; FLEISCH, H.A. Bisphosphonates: mechanisms of action. **J Clin Invest**, v.97, n.12, p.2692-2696, Jun. 1996
- 59 ROGERS, M.J. et al. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Bone**, v.24, Suppl.5, p.73S-79S, May 1999.

- 60 RUSSEL, R.G.G.; CROUCHER, P.I.; ROGER, M.J. Bisphosphonates: pharmacology mechanisms of action and clinical uses. **Osteoporos Int**, v.9, n.8, p.342-349, 1999
- 61 SATO, M. et al. Bisphosphonate action: alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. **J Clin Invest**, v.88, n.6, p.2095-2105, Dec. 1991.
- 62 SBH, SBC, SBN. Hipertensão arterial: a importância do problema. In:\_. **Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial 4<sup>a</sup>**, 2002, cap. 1, p. 1-2.
- 63 SHIBATA, T. et al. Effects of alendronate on restoration of biomechanical properties of periodontium in replanted rat molars. **J Periodont Res**, v.39, n.6, p.405-414, Dec. 2004.
- 64 SILVA, C.M.O.M. **Avaliação do alendronato sódico sobre a reparação óssea na ausência dos hormônios ovarianos. 2000.** 102f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos.
- 65 SUGAWARA, S. et al. Contrasting effects of an aminobisphosphonate, a potente inhibitor of bone resorption, on lipopolysaccharide-induced production of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in mice. **Br J Pharmacol**, v.125, n.4, p.735-740, Oct. 1998. Disponível em: <http://www.stockton-press.co.uk/bip>. Acesso em: 11 abr 2005.



- 66 SWEETMAN, S. **Martindale**: the complete drug reference. 34<sup>a</sup>.ed. London: Pharmaceutical Press. 2004, 2768p.
- 67 TAKAISHI, Y. et al. Clinical effect of etidronate on alveolar pyorrhea associated with chronic marginal periodontitis: report of four cases. **J Int Med Res**, v.29, n.4, p.355-365, July- Aug. 2001.
- 68 TEN CATE, R.T. Osso. In:\_. **Histologia bucal**: desenvolvimento, estrutura e função. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap.7, p.101-123.
- 69 TENENBAUM, H. C. et al. Bisphosphonates and periodontics: potential applications for regulation of bone mass in the periodontium and other therapeutic/diagnostic uses. **J Periodontol**, v.73, n.7, p.813-822, July 2002.
- 70 TORTORA, G.J.; GRABOWSKI, S.R. O sistema cardiovascular: os vasos sanguíneos e a hemodinâmica. In: \_. **Princípios de anatomia e fisiologia**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002. Cap.21, p.611-74.
- 71 TRIANTAFYLLIDI, E. et al. Study of hypertension in spontaneous hypertensive rats by sequencing the genomic DNA of  $\alpha_{2B}$  receptors. **Hellenic J Cardiol**, v.45, p.64-70, 2004.
- 72 TSUDA, K.; NISHIO, I; MASUYAMA, Y. Bone mineral density in women with essential hypertension. **Am J Hypertens**, v.14, n.7, Pt 1, p.704-707, July 2001. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>. Acesso em: 22 nov 2004.

- 73 UDENFRIEND, S. et al. Spontaneously hypertensive (SHR) rats: guidelines for breeding, care and use. **ILAR News**, v.19, n.3, p.G3-20, 1976.
- 74 UZAWA, T. et al. Comparison of the effects of intermittent and continuous administration of human parathyroid hormone (1,34) on rat bone. **Bone**, v.16, n.4, p.477-484, Apr. 1995.
- 75 WANG, T. M. et al. Evidence for reduced cancellous bone mass in the spontaneously hypertensive rat. **Bone Miner**, v.20, n.3, p.251-264, Mar. 1993.
- 76 WEINREB, M. et al. Histomorphometrical analysis of the effects of the bisphosphonate alendronate on bone loss caused by experimental periodontitis in monkeys. **J Periodontal Res**, v.29, n.1, p.34-40, Jan. 1994.
- 77 WORLD HEALTH ORGANIZATION, International society of hypertension writing group. **J Hypertens**, v.21, n.11, p.1983-1992, 2003.
- 78 WOLF, G.; WENZEL, U. O. Angiotensin II and cell cycle regulation. **Hypertension**, v.43, p.693-698, 2004. Disponível em: [www.hypertensionaha.org](http://www.hypertensionaha.org). Acesso em: 23 jan 2006.
- 79 WRIGHT, G.L.; DeMOSS, D. Evidence for dramatically increased bone turnover in spontaneously hypertensive rats. **Metabolism**, v.49, n.9, p.1130-1133, Sep. 2000.

- 80 YAMAGUCHI, K. et al. Involvement of interleukin-1 in the inflammatory actions of aminobisphosphonates in mice. **Br J Pharmacol**, v.130, n.7, p.1646-1654, Aug. 2000. Disponível em: <http://www.nature.com/bjp>. Acesso em: 19 set 2005.
- 81 YAFFE, A. et al. Local delivery of an amino bisphosphonate prevents the resorptive phase of alveolar bone following mucoperiosteal flap surgery in rats. **J Periodontol**, v.68, n.9, p.884-889, Sep. 1997.
- 82 YAFFE, A. et al. The effect of topical delivery of novel bisacylphosphonates in reducing alveolar bone loss in the rat model. **J Periodontol**, v.71, p.1607-1612, Oct. 2000
- 83 YAMORI, Y. et al. Stroke-prone SHR (SHRSP) as a model for osteoporosis. **Clin Exp Hypertens**, v.13, n.5, p.755-762, 1991.

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

NOBRE, M.D.P. **Local action of alendronate sodium on bone repair of spontaneously hypertensive rat (SHR) femurs.** 2006. 116f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2006.

### ABSTRACT

*This study evaluated the local action of alendronate sodium on bone repair in spontaneously hypertensive rats (SHR). A bone defect of diameter 2,5mm was created in forty males and forty females. Four groups were created according to the treatment received: control (C), amido (Am), alendronate 1mol (A1) and alendronate 2mol (A2). The C group did not have their defect filled in with any material. The animals were sacrificed seven and 21 days after the surgical procedure. Histological and histomorfometric analyses were performed and the results submitted to ANOVA statistical analysis. On the seventh day, all groups presented a connective tissue with hemorrhage and inflammatory cells in the bone defect. In some groups osteoid matrix was observed. In A1 and A2 groups, the animals also presented a fibrin deposition. After 21 days, a formation of bone trabeculae was observed closing the superficial extension of the bone defect in C and Am groups. On male rats of group A1, the trabeculae formation projected from inside the bone medulla to the defect site, without completely closing it. In the others animals of groups A1 and A2, bone trabeculae were not observed in the defect site. It was only observed a deposition of dense collagen fibers and minimal osteoid matrix. An important histological feature found in this study was the formation of extra-cortical subperiosteal bone in the animals of A1 and A2 groups. The study concluded that the local administration of alendronate sodium did not contribute for the bone repair, in this experimental model.*

**KEYWORDS:** Alendronate; rats, inbred SHR; hypertension; bone regeneration

Autorizo a reprodução xerográfica deste documento

São José dos Campos, 25 de Julho de 2006

---

Mônica Dal Pian Nobre