

DOUGLAS BERTAZO MUSSO

**USO TÓPICO DO ALENDRONATO DE SÓDIO ASSOCIADO AO BIO-OSS® NO
REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS -
ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO EM CALVÁRIA DE RATOS**

Vitória-ES, 2015

DOUGLAS BERTAZO MUSSO

**USO TÓPICO DO ALENDRONATO DE SÓDIO ASSOCIADO AO BIO-OSS® NO
REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS -
ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO EM CALVÁRIA DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos à obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniela Nascimento Silva

Vitória-ES, 2015

Dedicatória

A **DEUS**, por me enviar a este mundo no melhor endereço: **Meus pais**.

Aos meus pais Silvio Romero Loureiro Musso e Laura Heloiza Bertazo Musso, a quem devo tudo o que sou e conquistei. Obrigado pelo carinho e amor incondicional, por ensinar-me a lutar e persistir, por me tornar um ser, humano e digno. Esta conquista, mais do que minha, é de vocês.

"O Mestre na arte da vida faz pouca distinção entre o seu trabalho e o seu lazer, entre a sua mente e o seu corpo, entre a sua educação e a sua recreação, entre o seu amor e a sua religião. Ele dificilmente sabe distinguir um corpo do outro. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência em tudo que faz, deixando para os outros a decisão de saber se está trabalhando ou se divertindo. Ele acha que está sempre fazendo as duas coisas simultaneamente."

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, por toda vida; felicidades, tristezas, aprendizados, acertos, erros, perdas e ganhos. Senhor agradeço por minha família, e pelas pessoas com as quais convivo.

Fazer sempre de mim seu instrumento. Obrigado Senhor.

Aos **meus Pais**, o meu muito obrigado; por todos os ensinamentos sempre mostrando que a família é a base. Vocês são meu alicerce. Ao meu Pai pela serenidade e honestidade. A minha Mãe por ser uma guerreira nata, exigente, mas que também passa a mão na cabeça.

Aos **meus filhos, Bernardo e Arthur** pela constante lembrança de saber que vocês existem...

Aos **meus irmãos Régis e Sylvia**, por todas dificuldades e vitórias compartilhadas. Amo muito Vocês.

Aos **meus sobrinhos Bianca e Lorenzo**, pela felicidade que vocês trouxeram e proporcionam à nossa família.

Aos **meus avós paternos, Melziades** (*in memorian*) e **Catharina** (*in memorian*) pelas lembranças guardadas no meu peito.

Aos **meus avós maternos, Milta e João** pela companhia e amor de vocês.

A minha Orientadora **Professora Dra. Daniela Nascimento Silva**, pela imensa colaboração, sempre disposta, sábado domingo ou feriado. E para sempre vou lembrar: Foco Douglas...

Aos **meus amigos pessoais**, obrigado por compreenderem minha ausência.

Aos **amigos de curso**, o aprendizado da convivência em grupo, apesar da heterogeneidade, contribuiu e muito, para o meu crescimento.

A **Isabela Chiguti Yamashita e Carolina Santos Santana Ferreira**, o companheirismo e a parceria de vocês, ao longo destes anos de intenso convívio, fez valer a pena pelas risadas, palhaçadas e cobranças. O meu muito obrigado.

Que nunca nos afastemos.

Ao **médico veterinário Dr. Rodolpho José da Silva Barros**, responsável pelo Biotério da Ufes, pela dedicação, atenção e primorosa assistência para que o trabalho respeitasse o protocolo da CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais e as exigências do COBEA - Conselho Brasileiro de Experimentação Animal. Muito Obrigado.

Agradeço a responsável pelo laboratório de Histologia, **Luciene Bessoni Oliveira e Rafaela Araújo Fernandes**; sem a ajuda de vocês, não teria concluído com êxito e de forma tão satisfatória a confecção e fotografias das lâminas histológicas.

A **João Batista** funcionário do biotério, por suas valiosas e incansáveis horas dedicadas aos cuidados de meus preciosos objetos de estudo. – Meus Ratos.

À coordenadora do biotério da UFES, **Dr^a Lívia Carla de Melo Rodrigues**, e à **Dra. Ana Paula Santana de Vasconcellos Bitencourt**, por serem tão prestimosas e sempre solícitas para o prosseguimento e conclusão do trabalho.

Às professoras de Cirurgia Bucomaxilofacial II, **Rossiene Motta Bertollo e Martha Alayde Alcântara Salim Venâncio**, pelo intenso e pacífico convívio.

Às professoras de Patologia Bucal, **Liliana Aparecida Pimenta de Barros, Rosa Maria Lourenço Carlos Maia e Tânia Regina Grão Velloso**, pela atenção dedicada, e instruções de como melhorar as imagens histológicas. Muito obrigado.

Às professoras da banca de qualificação deste trabalho, **Rossiene Motta Bertollo e Liliana Aparecida Pimenta de Barros**, pelas sugestões na melhora do trabalho.

Aos professores do Curso de Mestrado, **Alfredo Carlos Rodrigues Feitosa, Karla Loureiro Almeida Koburn, Francisco Carlos Ribeiro, Rogério Albuquerque Azeredo, Edson Theodoro Santos Neto, Letícia da Gama Nogueira Souza**, por todos ensinamentos. O meu Muito Obrigado!

A **Regina Sales**, secretária do PPGCO pela atenção e carinho a nós dedicados.

A **Rosimery dos Santos Pereira** pelos cafezinhos, com um simpático sorriso
sempre me atendeu.

Ao amigo **Leonardo Bof Loureiro**, apesar de anos afastados, sempre solícito e
muito atencioso ao ensinar-me a trabalhar com o programa AutoCAD.

Ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da UFES, em especial a
Professora Dra. Selva Maria Gonçalves Guerra, por sua dedicação ao que faz;
isso faz sonhos tornarem-se reais.

Aos **pacientes** por compreenderem minha ausência.

Aos **animais experimentais**, todo meu respeito.

À **FAPES** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo, pelo apoio
financeiro a esta pesquisa.

RESUMO

O alendronato de sódio (ALN) tem demonstrado um efeito anabólico no reparo ósseo quando associado aos enxertos provenientes de osso bovino liofilizado, porém a forma de administração e a concentração ainda são objeto de investigação.

Objetivo: Esta pesquisa avaliou o efeito do uso tópico do ALN a 0,5%, utilizado isoladamente ou associado ao osso bovino liofilizado (Bio-Oss®), sobre o percentual de neoformação óssea e a absorção dos grânulos do enxerto. **Metodologia:** Duas cavidades de 5mm de diâmetro foram confeccionadas na calvária de 18 ratos Wistar e preenchidas com: ALN 0,5% veiculado em esponja de gelatina (grupo A - GA); Bio-Oss® (grupo B - GB); Bio-Oss® embebido em ALN 0,5% (grupo AB - GAB); coágulo sanguíneo (grupo controle - GC). Os animais foram eutanasiados aos 90 dias pós-operatórios. Os espécimes foram analisados histologicamente (hematoxilina/eosina) e por histomorfometria com auxílio do software AutoCAD®, quanto ao percentual de neoformação óssea e de remanescentes de grânulos de Bio-Oss®. Na análise estatística, os grupos foram comparados utilizando o teste “t” de Student para amostras pareadas ($p \leq 0,05$). **Resultados:** As médias dos percentuais de neoformação óssea foram: GA = $40,4 \pm 22,2$; GB = $46,0 \pm 22,0$; GAB = $29,9 \pm 17,8$; GC = $49,9 \pm 16,4$, enquanto a média dos percentuais de remanescentes de grânulos de Bio-Oss® foram: GB = $9,2 \pm 4,5$ e GAB = $12,2 \pm 7,2\%$. Houve diferença estatisticamente significativa no percentual de neoformação óssea apenas entre o grupo GC e GAB ($p = 0,025$), com preenchimento tecidual do defeito ósseo sem diferença estatística em virtude da presença dos grânulos do enxerto. Não houve diferença estatisticamente significativa no percentual de remanescentes de grânulos entre os grupos. **Conclusão:** O uso do ALN 0,5% tópico isoladamente nas cavidades ósseas não alterou o percentual de neoformação óssea. Quando associado ao Bio-Oss®, diminuiu o percentual de neoformação óssea e não interferiu na reabsorção dos grânulos do enxerto.

Descritores¹: Transplante Heterólogo, alendronato, calvária, ratos.

¹ Descritores em ciências da saúde. www.decs.bvs.br

ABSTRACT

Alendronate of sodium has shown the anabolic effect in bone healing when associated in the grafts from lyophilized bovine bone, but a form of administration and the concentration are still under investigation. **Objective:** This study evaluated the effect of topical of 0.5% ALN, used alone or in association with the lyophilized bovine bone (Bio-Oss®), on the percentage of bone formation and absorption of graft. **Methodology:** Two 5mm diameter cavities were made in the cranium of 18 Wistar rats and filled with 0.5% ALN, broadcasted in gelatin sponge (Group A – GA) Bio-Oss® (Group B – GB); Bio-Oss® soaked in 0.5% ALN (Group AB – GAB); blood clot (Control Group – GC). The animals were euthanized at 90 days postoperatively. The specimens were analyzed histologically (hematoxylin-eosin) and for histomorphometric analysis with the aid of AutoCAD® software, as the percentage of bone formation and remnants of Bio-Oss® granules. In the statistical analysis, the groups were compared using the “t” test of Student for paired samples ($p \leq 0.05$). **Results:** The mean bone formation percentages were: GA = $40.4 \pm 22.2\%$; GB = $46.0 \pm 22.0\%$; GAB = $29.9 \pm 17.8\%$; GC = $49.9 \pm 16.4\%$, as long as the average of the percentages of the remaining granules of Bio-Oss was GB = 9.2 ± 4.5 ; GAB = $12.2 \pm 7.2\%$. There was a significant statistical difference in the percentage of bone formation only between CG and GAB ($p = 0.025$), with the defect filled in without statistical difference as result of the presence of the granules of the graft. There was no significant statistical difference in the percentage of remaining granules between the groups. **Conclusion:** The topical use of ALN 0.5% isolated in the bone cavities did not change the percentage of bone formation. When combined with Bio-Oss®, decreased the percentage of bone formation and did not interfere in the reabsorption of the graft.

Descriptors²: Transplantation heterologous, Alendronate, Skull, Rat.

² Descritores em ciências da saúde. www.decs.bvs.br

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Quadro 1 - Distribuição dos grupos de acordo com o tratamento instituído. | 29 |
| Figura 1 - Mecanismo de ação molecular dos bisfosfonatos. | 21 |
| Figura 2 - Cloridrato de Ketamina 10% (Ketamina Agener®) e Cloridrato de Xilazina 2% (Anasedan®) utilizados para anestesia geral e Enrofloxacino 2,5% (Flotril®) como antibioticoterapia profilática. | 30 |
| Figura 3 - A) Incisão dermoperiosteal coronal, após tricotomia. B) Descolamento do periósteo e exposição da calvária. | 31 |
| Figura 4 - Representação esquemática da calvária do rato. Defeitos ósseos de 5mm de diâmetro (d) (cavidades direita e esquerda), confeccionados nos ossos parietais. | 31 |
| Figura 5 - A) Confeção das cavidades ósseas utilizando broca multilaminada em forma de pera, em baixa rotação, sob irrigação com soro fisiológico. B) Cavidades ósseas direita e esquerda confeccionadas nos ossos parietais a cada lado da sutura sagital mediana. | 31 |
| Figura 6 - A) Solução de ALN 0,5%; B) Esponja de gelatina reabsorvível, utilizada como veículo para inserção do alendronato de sódio na cavidade óssea; C) Disco de esponja de gelatina de 5mm embebido na solução de ALN..... | 32 |
| Figura 7 - A) Grânulos de Bio-Oss®0.25-1.0mm e B) respectiva embalagem com especificações..... | 33 |
| Figura 8 - A) Cavidade óssea direita preenchida com grânulos de Bio-Oss® e cavidade esquerda sem material (coágulo sanguíneo). B) Sutura com pontos isolados utilizando fio nylon 5-0..... | 33 |
| Figura 9 - Preparo das peças para inclusão em parafina. A) Corte longitudinal separando as cavidades entre si. B) Corte longitudinal dos defeitos ao longo de seus maiores diâmetros. | 35 |
| Figura 10 - Fotomicroscópio óptico Primo Star Zeiss com câmera acoplada AxioCam ERc5s..... | 37 |
| Figura 11 - Montagem das imagens para obtenção de todo o defeito ósseo. | 37 |
| Figura 12 - Histomorfometria com auxílio do AutoCAD®: área total do defeito (linha vermelha), do osso neoformado (linha preta), do tecido conjuntivo (linha amarela) e dos grânulos de Bio-Oss® (linha azul), no defeito ósseo do grupo AB (Alendronato 0,5%+Bio-oss®). | 38 |
| Figura 13 - Histomorfometria com auxílio do AutoCAD®: área total do defeito (linha vermelha) tecido ósseo neoformado (linha preta) tecido conjuntivo (pontos azuis ligados pela linha amarela), no defeito ósseo do grupo controle..... | 38 |
| Figura 14: Fotomicrografia do defeito ósseo no grupo controle mostrando áreas de tecido ósseo neoformado (ON) circundada por tecido conjuntivo (TC) altamente celular e osteócitos (OC) enclausurados em suas respectivas lacunas (HE, Aumento 10X/40X)..... | 39 |

Figura 15A e B: Fotomicrografia do defeito ósseo do grupo A (Alendronato 0,5%), mostrando área de osso neoformado (ON), na superfície interna, e superiormente circunscrita por tecido conjuntivo fibroso (TC). Nota-se a presença de osteócitos aprisionados em suas lacunas (HE, Aumento 10X e 40X). Nota-se osso neoformado maduro (Aumento 40X, B). No limite do defeito observa-se uma linha nítida basofílica, caracterizando a linha de reversão (setas).....40

Figura 16A e B: Fotomicrografia do defeito ósseo do grupo B (Bio-Oss®), evidenciando áreas de osso neoformado (ON) com osteócitos (OC), áreas remanescentes dos grânulos de Bio-Oss® (BO) circundado por tecido conjuntivo fibroso altamente celular (TC) (HE, em A aumento de 10X e, em B aumento de 40X).....40

Figura 17A a D: Fotomicrografia do defeito ósseo do GAB (Alendronato 0,5% + Bio-Oss®). Observa-se áreas preenchidas pelo Bio-Oss® (BO) remanescente, assim como espaços negativos deixados pelos grânulos de BO; evidenciada por estreitas faixas de osso recém-formado, circundadas por áreas de tecido conjuntivo (TC) (HE, Aumentos: em A de 4X, em B e C de 10X, e D de 40X.....41

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Caracterização da amostra, estratificada por grupo e tipo de tecido observado ou material remanescente. Vitória/ES, Brasil (2015). | 43 |
| Tabela 2 - Percentual de osso neoformado e tecido conjuntivo, no reparo ósseo de calvária de ratos no período de 90 dias pós-operatórios – Grupo A (ALN 0,5%) em comparação com o GC (coágulo sanguíneo). Vitória/ES, Brasil (2015). | 44 |
| Tabela 3 - Percentual de osso neoformado e tecido conjuntivo no reparo ósseo em calvária de ratos no período de 90 dias pós-operatórios – GB (BIO-OSS®) X GC (coágulo sanguíneo). Vitória/ES, Brasil (2015). | 44 |
| Tabela 4 - Percentual de osso neoformado, tecido conjuntivo e Bio-Oss® remanescente no reparo ósseo em calvária de ratos no período de 90 dias pós-operatórios – GAB (BIO-OSS®+ ALN 0,5%) X GC (coágulo sanguíneo). Vitória/ES, Brasil (2015). | 45 |
| Tabela 5 - Percentual de osso neoformado e tecido conjuntivo no reparo ósseo em calvária de ratos no período de 90 dias pós-operatórios – GAB (BIO-OSS®+ ALN 0,5%) X GB (BIO-OSS®). Vitória/ES, Brasil (2015). | 46 |
| Tabela 6 - Percentual de osso neoformado e tecido conjuntivo no reparo ósseo em calvária de ratos no período de 90 dias pós-operatórios – GAB (BIO-OSS® + ALN 0,5%) em comparação com o GA (ALN 0,5%). Vitória/ES, Brasil (2015). | 47 |
| Tabela 7 - Percentual de osso neoformado e tecido conjuntivo no reparo ósseo em calvária de ratos no período de 90 dias pós-operatórios – GB (BIO-OSS®) em comparação com o GA (ALN 0,5%). Vitória/ES, Brasil (2015). | 47 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|-------|--|
| % | Porcento |
| BF | Bisfosfonato |
| BFs | Bisfosfonatos |
| ALN | Alendronato |
| MMP | Metaloproteinase de matriz |
| g | Gramas(s) |
| mg | Miligrama(s) |
| µg | Micrograma(s) |
| kg | Kilograma(s) |
| mg/kg | Miligrama por kilograma |
| ng/mL | Nanograma por mililitro. |
| mg/kg | Miligrama por kilograma |
| mg/mL | Miligrama por mililitro |
| ® | Marca registrada |
| mM | Milimolar |
| rhBMP | Proteína óssea morfogenética (Rhesus) |
| RANKL | <i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i> - ligante do receptor do fator nuclear kapa B |
| GA | Grupo Alendronato |
| GB | Grupo Bio-Oss® |
| GAB | Grupo Alendronato + Bio-Oss® |
| GC | Grupo Controle |
| °C | Grau celsius |
| Fig. | Figura |
| H | Hora(s) |
| mL | Mililitro(s) |
| mm | Milímetro(s) |
| cm | Centímetro(s) |
| tnt | Tecido não tecido. |
| L | Litro(s) |
| HE | Hematoxilina-eosina. |
| DPX | <i>Di-n-butyl-Phthalate in Xylene</i> - Ftalato de di-N-Butil em xilol |

| | |
|-------|---|
| ON | Osso neoformado |
| OC | Osteócito |
| BO | Bio-oss® |
| TC | Tecido conjuntivo |
| Min | Mínimo |
| Max | Máximo |
| M | Média |
| DP | Desvio padrão |
| p | probabilidade de erro |
| FAPES | Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo |
| PPGCO | Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| RESUMO | 8 |
| ABSTRACT | 9 |
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES | 10 |
| LISTA DE TABELAS | 12 |
| SUMÁRIO | 15 |
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 20 |
| 2.1 ALENDRONATO DE SÓDIO | 20 |
| 2.2 ESTUDOS EXPERIMENTAIS SOBRE A AÇÃO DO ALN NO REPARO ÓSSEO 22 | |
| 2.3 ASSOCIAÇÃO BIO-OSS®-ALENDRONATO | 25 |
| 3 PROPOSIÇÃO | 27 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 27 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 27 |
| 4 METODOLOGIA | 28 |
| 4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS..... | 28 |
| 4.2 DELINEAMENTO DA PESQUISA | 28 |
| 4.3 AMOSTRA E DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS | 28 |
| 4.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO | 29 |
| 4.5 MORTE DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS PEÇAS OPERATÓRIAS..... | 34 |
| 4.6 CONFECÇÃO DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS | 35 |
| 4.7 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA | 37 |
| 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 39 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5 | RESULTADOS | 40 |
| 5.1 | RESULTADOS HISTOLÓGICOS DESCRITIVOS | 40 |
| 5.1.1 | Grupo controle (GC) - Coágulo sanguíneo | 40 |
| 5.1.2 | Grupo A (GA) - ALN 0,5% | 40 |
| 5.1.3 | Grupo B - Bio-Oss® | 41 |
| 5.1.4 | Grupo AB (GAB) - ALN 0,5%+ Bio-Oss® | 42 |
| 5.2 | RESULTADOS ESTATÍSTICOS | 42 |
| 5.2.1 | Grupo A (ALN 0,5%) X Grupo Controle (Coágulo Sanguíneo) | 43 |
| 5.2.2 | Grupo B (BIO-OSS®) X Grupo Controle (Coágulo Sanguíneo) | 44 |
| 5.2.3 | Grupo AB (BIO-OSS® + ALN 0,5%) X Grupo Controle (Coágulo Sanguíneo) | 45 |
| 5.2.4 | Grupo B (BIO-OSS®) X Grupo AB (BIO-OSS®+ ALN 0,5%) | 45 |
| 5.2.5 | Grupo A (ALN 0,5%) X Grupo AB (BIO-OSS®+ ALN 0,5%) | 46 |
| 5.2.6 | Grupo B (BIO-OSS®) X Grupo A (ALN 0,5%) | 47 |
| 6 | DISCUSSÃO | 48 |
| 7 | CONCLUSÕES | 54 |
| | REFERÊNCIAS | 55 |
| | ANEXO A - APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UFES | 61 |
| | ANEXO B - LAUDO FARMACÊUTICO DA MANIPULAÇÃO DO ALENDRONATO DE SÓDIO | 62 |

1 INTRODUÇÃO³

Os enxertos autógenos são considerados padrão-ouro em termos de potencial osteogênico, porém, sua disponibilidade é limitada e a necessidade de se obter fragmentos ósseos para enxertia requer um sítio cirúrgico adicional e confere maior morbidade ao procedimento (FROUM et al., 1998; WHEELER, 1997). Tem sido relatada uma reabsorção do enxerto autógeno acima de 56%, em quatro meses, tanto em estudos animais como em humanos (BLOMQUIST et al., 1998; ZECHA, 2011). Portanto, os substitutos ósseos como os enxertos bovinos constituem uma opção atrativa, pois eliminam a área doadora do próprio indivíduo, sua disponibilidade é ilimitada, são disponíveis em várias formas e tamanhos, mostram excelentes propriedades de osteocondutividade e possuem menor taxa de reabsorção que o enxerto autógeno (PETTINICCHIO et al., 2012).

O Bio-Oss® é um osso bovino liofilizado, estéril, desproteinizado, formado principalmente por hidroxiapatita natural (PETTINICCHIO et al. 2012), que tem ampla aplicação na Odontologia, como reconstrução do rebordo alveolar, preenchimento de defeitos intraósseos, periodontais, periimplantares, alvéolos dentários, defeitos associados a regeneração óssea guiada, como também em cirurgias para elevação de soalho do seio maxilar. Apesar das várias indicações, uma das desvantagens do Bio-Oss® é o tempo entre a enxertia e sua integração ao leito receptor, que pode variar de 6 a 10 meses (WALLACE et al., 2005) ou mais, o que estimula a busca de sua associação com outras substâncias que acelerem a neoformação óssea local.

A regeneração do tecido ósseo lesado inclui uma complexa sequência de eventos moleculares que envolvem recrutamento, ligação e proliferação de células progenitoras, acompanhada pela diferenciação celular nos fenótipos apropriados que são capazes de restaurar o dano tecidual (BINDERMAN, 1991). Os estudos sobre regeneração óssea têm incluído o uso de mediadores biológicos para

³ O texto desta tese obedeceu às normas de Informação e documentação – Citações em documentos – Apresentação da ABNT - NBR 10520, de agosto de 2002. Disponível em: <http://www.abnt.org.br/> Acesso em 11.11.2015.

melhorar a quantidade e a qualidade do osso a ser regenerado (WOZNEY, 1992). Os bisfosfonados (BFs) constituem um grupo de mediadores do metabolismo ósseo que são potentes inibidores da reabsorção óssea e tem sido efetivamente usado para controlar a osteólise ou minimizar a perda óssea resultantes de diferentes enfermidades (LIBERMAN, 1995). Os substitutos ósseos sintéticos permitem a adição de medicamentos, hormônios, fatores de crescimento e células-tronco em suas matrizes (grânulos) (PETTINICCHIO et al., 2012).

Os BFs são utilizados como agentes antirreabsortivos para o tratamento de doenças que tem o aumento na reabsorção osteoclástica, incluindo a osteoporose pós-menopausa, doença de Paget e tumores associados à osteólise (COXON et al., 2006). Os BFs que contêm nitrogênio têm maior potência para inibir a reabsorção óssea. O alendronato de sódio (ALN) é um BF nitrogenado, disponível no mercado desde 1990, cuja atividade sobre os osteoclastos é aproximadamente 70 vezes mais potente se comparado aos BF que não contêm nitrogênio (COXON et al., 2006; MENEZES et al. 2005).

Uma única dose de ALN aplicada localmente pode permitir uma adequada distribuição do medicamento no osso, devido à alta afinidade do BF à parte mineral deste tecido, com conseqüente redução na reabsorção do osso e indução a maior regeneração óssea alveolar. Sendo assim, o ALN pode ser considerado como opção terapêutica em diferentes casos de remodelação óssea e no tratamento das reabsorções ósseas (YAFFE et al., 1999; SRISUBUT et al., 2007).

Vários estudos têm investigado o uso dos BFs conjuntamente com enxertos ósseos autógenos durante procedimentos de regeneração óssea (HABIBOVIC et al. 2005; ALTUNDAL; GURSOY, 2005; SEO et al. 2010). Nos estudos de Altundal et al. (2007), quando os BFs foram administrados sistemicamente e o enxerto autógeno foi colocado no defeito ósseo em ratos, a formação óssea foi estimulada e a reabsorção foi suprimida, sugerindo que a administração do ALN é uma potencial opção terapêutica para diminuir a reabsorção de enxertos ósseos, assim como obter uma osseointegração mais rápida. Do mesmo modo, quando o enxerto ósseo autógeno medular foi pré-tratado topicamente com ALN não sofreu reabsorção quando enxertado no fêmur de ratos. Admite-se a hipótese dos BFs, especificamente o ALN, poder aumentar a previsibilidade do enxerto autógeno (TOKER et al., 2012).

No entanto, poucos estudos disponíveis na literatura analisaram a associação de BF em diferentes concentrações com o Bio-Oss® no processo de reparo ósseo, mas de modo geral todos eles verificaram efeito positivo no processo de reparo ósseo resultante desta associação, sendo este dose-dependente (HOUSHMAND et al., 2007; ROCHA, 2013, MOLLER et al., 2014; KIM et al., 2015).

Diante do exposto, o presente estudo propõe-se a avaliar o efeito do ALN a 0,5% utilizado isoladamente ou em associação com osso bovino liofilizado (Bio-Oss®) no processo de reparo de defeitos ósseos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ALENDRONATO DE SÓDIO

O ALN é um aminobifosfonado produzido como sal monossódico do ácido alendrônico ($C_4H_{13}NO_7P_2$), disponível frequentemente na forma triidratada ($C_4H_{12}NNaO_7P_2 \cdot 3H_2O$). Possui estrutura química análoga ao pirofosfato, inibe a reabsorção óssea, sem inibir de forma acentuada a remineralização. O peso molecular do ALN triidratado é 325,12g/L. O grupo amina na cadeia lateral aumenta a potência na inibição da reabsorção óssea (PARFITT, 1999).

Começou a ser utilizado em 1990 no tratamento da osteoporose em pacientes de alto risco, e posteriormente foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da osteoporose pós-menopausa. É também utilizado no tratamento de osteoporose em pacientes do sexo masculino, doença de Paget, osteodistrofia renal e outras doenças que exibem redução da atividade dos osteoclastos (LASSETER et al., 2005; ASSAEL, 2009).

Possui grande afinidade com a matriz óssea, de tal forma que cerca de 50% da droga absorvida permanece fixa no osso (KANIS et al., 1995; GANGULI et al., 2002; VEENA; PRASAD, 2010).

O mecanismo de ação do ALN ainda não está bem desvendado. As observações clínicas e histológicas sugerem um envolvimento de recrutamento, ativação e apoptose dos osteoclastos (LAZAROVICI et al., 2009). Ao ser incorporado na matriz do tecido ósseo, torna-se farmacologicamente inativo, até que ocorra a remodelação óssea quando passa a interagir novamente com os osteoclastos (PORRAS; HOLLAND; GERTZ, 1999). De um modo geral, os BFs atuam causando efeito tóxico nos osteoclastos. Os não-nitrogenados são convertidos intracelularmente em análogos não hidrolizáveis de ATP (Adenosina trifosfato), os quais são tóxicos para as células. Os nitrogenados, como o ALN inibem a farnesil pirofosfatase sintetase (FPPS), que é uma enzima da via do mevalonato, resultando na inibição da síntese de isoprenóides geranylgeranyl pirofosfatase (GGPP), na prenilação de pequenas GTPs (Guanosina trifosfato), proteínas de ligação, como Ras e Rho que são responsáveis pela integridade do citoesqueleto e da sinalização intracelular. A

inibição da FPPS também faz com que a acumulação de isoprenóide difosfato (IPP), que está incorporada Apppl (um análogo de ATP capaz de induzir apoptose dos osteoclastos). A captação transitória de BPs nitrogenados por monócitos provoca acúmulo de IPP, que ativa γ , δ -T células e desencadeia a fase aguda da reação (RUSSEL; ROGERS, 1999; RUSSEL et al., 2008) (**Figura 1**).

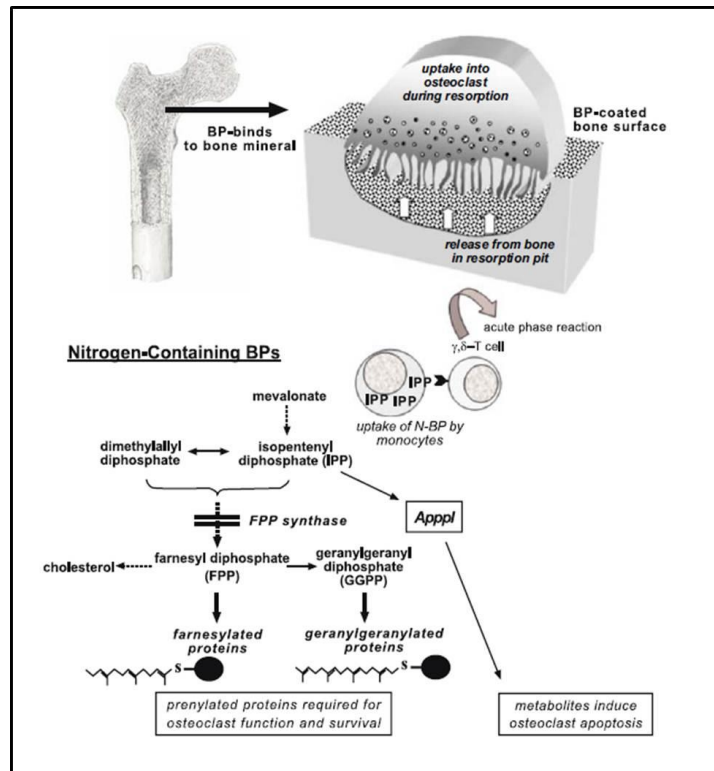


Figura 1 - Mecanismo de ação molecular dos bisfosfonatos.

Fonte: Modificado de Russel et al., 2008.

A supressão da atividade osteoclástica promove a perda da integridade do citoesqueleto, com desaparecimento da borda ondulada, que é a membrana convoluta dos osteoclastos, sendo essa uma forte indicação da inativação dos osteoclastos por BFs *in vivo*, seguida da apoptose (HALASY-NAGY; RODAN; RESZKA, 2001; BOIVING; MEUNIER, 2002; VAN BEEK; LOWIK; PAPAPOULOS, 2002)

Apesar da ação primária do ALN ser a inibição da reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos, alguns estudos têm demonstrado que esses medicamentos também interagem com os osteoblastos (REINHOLZ et al., 2000; FROMIGUE; BODY, 2002;

IM; QURESHI; KENNEY, 2004). Tem sido demonstrado que o ALN pode aumentar a proliferação e maturação de osteoblastos e inibir a sua apoptose. O efeito do ALN na atividade osteoblástica pode ser mais importante para o aumento na formação do osso durante a cura dos defeitos do que sua atividade nos osteoclastos (TENENBAUM et al., 2002; SCHWARTZ et al., 2011).

2.2 ESTUDOS EXPERIMENTAIS SOBRE A AÇÃO DO ALN NO REPARO ÓSSEO

Os primeiros relatos sobre o efeito do ALN sobre o remodelamento ósseo alveolar encontrados na literatura foram de Yaffe et al. (1995). Os autores avaliaram a ação do ALN tanto local (0,15; 0,75 e 1,5 mg/mL) quando sistemicamente por via endovenosa (0,5mg/kg). Para isso, confeccionaram um retalho de espessura total em mandíbula de ratos. O ALN local foi aplicado sobre o rebordo alveolar veiculado em esponjas de colágeno embebidas nas diferentes concentrações da substância, durante 10 segundos. No lado controle, foi utilizada solução salina. A partir dos resultados obtidos por radiomicrografia de alta resolução, os autores não observaram diferença estatisticamente significativa na inibição da reabsorção óssea entre o grupo controle e o testado, quando da aplicação local do ALN, enquanto que a administração sistêmica reduziu significativamente a reabsorção óssea.

Em 1999, Yaffe et al. avaliaram a eficácia da absorção do ALN pelo osso, por meio de estudo em ratos submetidos à cirurgia para deslocamento de retalho mucoperiosteal. Uma esponja de gelatina embebida em 10 μ L de ALN foi inserida sobre o osso exposto na região de pré-molares e molares, em ambos os lados da mandíbula. Os autores observaram que os níveis de ALN estavam mais elevados no local da cirurgia e que a absorção pelo osso alveolar no lado experimental foi de aproximadamente 10% da dose; no lado contralateral, a absorção foi 20 a 30% do total absorvido no lado experimental. A droga foi encontrada no osso da tíbia, nos tecidos mole e ósseo do lado contralateral, indicando absorção sistêmica.

Srisubut et al. (2007) avaliaram o efeito anabólico do ALN 20mg/mL associado ao vidro bioativo e aplicado localmente em mandíbula de 26 ratos distribuídos em grupos experimental (vidro bioativo embebido em solução de ALN) e controle (vidro bioativo embebido em solução salina). Após quatro semanas, por meio de análise

histomorfométrica, constataram que no grupo experimental a neoformação óssea foi estatisticamente superior à do grupo controle, mas o número de osteoclastos não foi alterado. Concluíram que o ALN local em dose única melhora a neoformação óssea e pode ser considerado como uma opção terapêutica para reabsorção óssea.

Naidu et al. (2008) pesquisaram os efeitos do ALN 10^{-6} mol/L, 10^{-5} mol/L, 10^{-4} mol/L e 10^{-3} mol/L na viabilidade e função celular dos osteoblastos em meios de cultura, e encontraram viabilidade celular significativamente diminuída, diretamente proporcional à concentração da droga; observou que em baixas concentrações e em tratamentos estendidos, o ALN pode trazer alguns efeitos benéficos, sem diminuir a viabilidade celular. Altas concentrações das drogas diminuíram significativamente a viabilidade celular e foram citotóxicas. A viabilidade celular foi significativamente maior no grupo controle em relação ao experimental em todos os tempos avaliados.

O efeito de diferentes concentrações de ALN 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M na reabsorção óssea de enxertos autógenos foi objeto de estudo de Kawata et al. (2004). Os autores testaram o efeito do ALN na diferenciação osteoclástica e no volume ósseo em 135 camundongos submetidos à cirurgia para colocação de enxerto ósseo autógeno no tecido subcutâneo. Obtiveram uma menor reabsorção óssea na presença do ALN 10^{-4} e que a quantidade de reabsorção foi dose dependente. No grupo controle, o enxerto desapareceu em cinco semanas, no entanto, no grupo experimental, apenas cerca de 20 a 40% do enxerto foi reabsorvido. O grupo experimental foi subdividido em dois novos grupos: um grupo recebeu injeção intraperitoneal de ALN cinco semanas após a colocação do enxerto e o outro não recebeu o ALN, tendo o grupo medicado demonstrado redução significativa no número de osteoclastos. O número de osteoclastos foi significativamente menor no grupo tratado com ALN, sugerindo que a reabsorção óssea nos estágios iniciais do enxerto é controlada pela ação do ALN. Os autores concluíram que o ALN na concentração de 10^{-4} M inibiu a reabsorção do enxerto ectópico.

Sun et al. (2012) analisaram o efeito do ALN 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} M, em cultura de osteoblastos humanos, sobre a expressão e atividade de metaloproteinases de matriz (MMP) e a expressão dos inibidores teciduais de MMPs em meios expostos a várias concentrações de ALN. Como resultado, observaram

que após três dias de tratamento as células permaneciam viáveis, porém a viabilidade diminuía de acordo com o aumento na concentração do ALN. Demonstrando assim que o efeito do ALN é dose dependente.

Altundal e Gursoy (2005) demonstraram em estudo realizado no fêmur de ratos, que o tratamento com injeção subcutânea de ALN 0,25mg/kg diariamente por 2, 4 e 12 semanas aumentou significativamente o número de osteoblastos, e ainda a área de neoformação óssea, mostrando que o tratamento com BFs podem prover benefícios, não somente com efeitos antirreabsortivos, mas também com efeitos na formação óssea.

Santamaria-Júnior et al. (2010) não encontraram diferença na densidade óssea alveolar na mandíbula de ratos tratados com ALN (1mg/kg, 2x por semana, via oral) e eutanasiados aos três meses de idade. Concluíram que o ALN não altera a morfologia do osso alveolar, mantendo as características teciduais estruturais, semelhante às de animais saudáveis.

Shimizu et al. (2012) observaram que o ALN 10 µg/100 g, por semana, aumenta a expressão de genes e de proteínas de membrana que atuam na ligação osteoclasto-osteoblasto, além de suprimir a expressão da sialoproteína óssea e da osteonectina. Verificaram também que após a ausência de osteoclastos, o ALN não afetou a diferenciação dos osteoblastos, indicando a necessidade de pré-osteoclastos para os efeitos do ALN. Sendo assim, acredita-se que a diferenciação dos osteoblastos e a mineralização está diretamente ligada aos precursores dos osteoclastos, ou seja, os osteoclastos apresentam receptores de membrana que se ligam a osteoblastos, estimulando ou suprimindo a diferenciação dos osteoblastos, e assim, a produção de matriz óssea.

Vicente-Neto et al. (2010) observaram, por meio de análise histomorfométrica, maior formação de tecido ósseo, em defeitos ósseos confeccionados em tíbias de ratos que fizeram uso de ALN 0,7mg/kg uma vez por semana, por via subcutânea.

2.3 ASSOCIAÇÃO BIO-OSS®-ALENDRONATO

Em 2007, Housmand et al. avaliaram, por meio de histomorfometria, o uso do pamidronato associado ao Bio-Oss® em defeitos criados em mandíbulas de ovelhas e observaram que esta associação melhorou as propriedades de osteocondução e regeneração óssea neste material, houve maior neoformação óssea e redução do número de osteoclastos.

Rocha (2013) investigou os efeitos do uso tópico do ALN, nas concentrações de 0,5 e 1%, associado ao Bio-Oss® inserido nos defeitos ósseos confeccionados em calvária de coelhos. Os resultados obtidos por radiomicrografias, aos 30 e 60 dias de pós-operatórios, mostraram que o ALN, em ambas as concentrações, quando adicionado ao osso bovino, acelerou o processo de reparo ósseo quando comparado com o osso bovino isoladamente, sendo que na concentração de 0,5% promoveu maior percentual de reparo ósseo (98%) que o Bio-Oss® isoladamente (84%).

Möller et al. (2014) investigaram se a aplicação tópica do ALN (1mg/mL), veiculado na membrana de colágeno ou em osso mineral bovino, previne a reabsorção da superfície de enxertos em bloco. Seis blocos ósseos corticoesponjosos proveniente de ramo mandibular de 08 porcos adultos foram fixados com parafusos de titânio no processo alveolar da mandíbula bilateralmente (três no lado teste e três no lado do controle), simulando aumento da crista óssea. Após a fixação, eles foram cobertos no lado do teste com: (1) membrana de colágeno Bio-Gide® impregnada com ALN; (2) Bio-Oss® embebido em ALN, e (3) solução de ALN. No lado do controle, foi realizado mesmo o tratamento, exceto a aplicação tópica do bisfosfonato. Após 3 meses, os animais foram sacrificados e a avaliação incluiu a marcação fluorocrômica e a mensuração do crescimento ósseo por microradiografia. Foi observado que o uso tópico do ALN reduziu a reabsorção óssea durante o processo de remodelação óssea, mas foram observadas áreas de osteonecrose na parte inferior dos enxertos ósseos, principalmente no grupo 2.

KIM et al. (2015) investigaram se o ALN (em alta=10mM e baixa =1mM concentrações) e a proteína óssea morfogenética recombinante-2 (rhBMP-2) tem efeito sinérgico na regeneração óssea, quando associados ao Bio-Oss®. O

experimento foi realizado em calvária de 36 seis ratos. Os animais foram sacrificados após 2, 4 e 8 semanas após a cirurgia. Após análise histomorfométrica, os autores consideraram que a associação rhBMP-2 + ALN em baixa concentração + Bio-Oss® apresenta melhores resultados pela redução da atividade de RANKL (fator de diferenciação osteoclástica), que o uso isolado dos mesmos.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do uso tópico do alendronato de sódio a 0,5%, utilizado isoladamente ou associado ao Bio-Oss[®], sobre o reparo ósseo, nos defeitos confeccionados em calvária de ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Descrever histologicamente o processo de reparo ósseo de cavidades confeccionadas em calvária de ratos preenchidas com ALN a 0,5%, associada ou não ao osso bovino liofilizado;
- b) Verificar, através de análise histomorfométrica, se o ALN a 0,5%, associado ou não ao osso bovino liofilizado, aumenta o percentual de neoformação óssea em defeitos produzidos na calvária de ratos;
- c) Verificar, através de análise histomorfométrica, se a adição de ALN a 0,5%, interfere no percentual de osso bovino liofilizado remanescente, enxertado em defeitos produzidos na calvária de ratos.

4 METODOLOGIA

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este trabalho foi realizado junto ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica do Curso de Odontologia da UFES, dentro da linha de pesquisa Bases biológicas e clínicas em Odontologia. Todos os procedimentos adotados durante as técnicas envolvendo os animais seguiram o que preconiza o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, em cumprimento à Constituição do Estado, Lei nº 11.915, artigo 82, inciso IV, de 21 de maio de 2003. A pesquisa foi desenvolvida após aprovação do seu projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFES, protocolo n. 010/2014 (Anexo A).

Foram adotados os Princípios Éticos em Experimentação Animal, preconizados pelo Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), instituição filiada ao *International Council for Laboratory Animal Science* e respeitados os preceitos apresentados pela Legislação Brasileira de Animais de Experimentação, Lei n.º 11.794, de 09 de outubro de 2008.

4.2 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Esta pesquisa foi desenvolvida dentro do paradigma tradicional quantitativo, grupo controle/pós-teste (CAMPBELL; STANLEY, 1979).

X_{GA} O
 X_{GAB} O
 X_{GB} O
 X_{GC} O

Onde: X = Tratamento; O = Observação/90 dias; GA = Alendronato; GAB = Bio-Oss® + Alendronato; GB = Bio-Oss®; GC = grupo controle/coágulo sanguíneo.

4.3 AMOSTRA E DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS

A amostra foi constituída por 18 ratos Wistar, machos, adultos, com peso corporal médio de 300g. Na calvária de cada animal, foram confeccionadas duas cavidades, totalizando 36 defeitos ósseos.

As cavidades ósseas foram preenchidas de acordo com o tratamento instituído de forma a constituir 04 grupos, conforme exposto no quadro 1.

Quadro 1 - Distribuição dos grupos de acordo com o tratamento instituído.

| GRUPOS | Substância | n (animais) | Cavidade óssea |
|--------|---------------------|----------------|-------------------|
| GA | ALN 0,5% | 09 | Cavidade direita |
| GAB | Bio-Oss® + ALN 0,5% | | Cavidade esquerda |
| GB | Bio-Oss® | 09 | Cavidade direita |
| GC | Coágulo sanguíneo | | Cavidade esquerda |

GA = Grupo A; GB = Grupo B; GAB = Grupo AB; GC = Grupo C; ALN = Alendronato de sódio

Os animais foram acondicionados em gaiolas coletivas de polipropileno com quatro ou cinco animais em cada gaiola, sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade ($50 \pm 10\%$) e ciclo claro/escuro de 12 horas (7-19h), com acesso à água e alimentação padrão (MP-77, Primor®) *ad libitum*. O reparo ósseo foi observado 90 dias após o procedimento cirúrgico.

4.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Biotério da UFES. Após a pesagem em balança de precisão, os animais foram anestesiados com Cloridrato de Ketamina 10% (0,05 mL/100 g)⁴ e Cloridrato de Xilazina 2% (0,025 mL/100 g)⁵ (**Figura 2**), por via intraperitoneal. Foi realizada profilaxia antibiótica com Enrofloxacino⁶ 2,5%, 10mg/kg de peso do animal, por via subcutânea, sob orientação do médico-veterinário⁷, responsável-técnico pelo Biotério da UFES.

⁴Ketamina Agener®. União Química Farmacêutica Nacional S/A. Embu-Guaçu /SP, Brasil

⁵Anasedan®, Sespo Indústria e Comércio Ltda. Paulínia/SP, Brasil

⁶Flotril® 2,5%, Intervet Schering-Plough, Rio de Janeiro/ RJ, Brasil

⁷ Dr. Rodolpho José da Silva Barros – CRMV-ES 1589



Figura 2 - Cloridrato de Ketamina 10% (Ketamina Agener®) e Cloridrato de Xilazina 2% (Anasedan®) utilizados para anestesia geral e Enrofloxacino 2,5% (Flotril®) como antibioticoterapia profilática.

Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2015.

Os ratos foram tricotomizados, com auxílio de aparador elétrico de pelos⁸, na região superior da cabeça, compreendida entre os pavilhões auriculares externos. A antissepsia da região tricotomizada, incluindo a pelagem em torno dessa área, foi realizada com digluconato de clorexidina a 2%⁹, seguida pela colocação de um campo cirúrgico de TNT, fenestrado, estéril, com dimensões de 20 cm X 20 cm, para expor a cabeça do animal e cobrir o restante do corpo, como barreira para controle de infecção. O procedimento cirúrgico ocorreu de forma independente, sobre uma bancada coberta com campo cirúrgico estéril descartável e com troca de material cirúrgico para cada animal.

Como anestésico local foi utilizado Cloridrato de Lidocaína a 2% com norepinefrina 1:100.000¹⁰, com infiltração anestésica subcutânea, com finalidade de hemostasia e analgesia transoperatória adicional, além de auxiliar no controle de dor no pós-operatório imediato. Após infiltração anestésica, foi realizada uma incisão dermoperiosteal coronal linear, com lâmina de bisturi n.º15, montada em cabo de bisturi Bard Parker n.º3, medindo cerca de 1,5 cm de extensão, compreendida entre as orelhas, sempre com apoio em base óssea (**Figura 3A**). Após esse procedimento, o periósteo foi divulsionado com descolador de Molt e afastado juntamente com os demais tecidos, expondo a superfície externa da calvária (**Figura 3B**).

⁸Philips StyleShaver - QS6141/32, Philips, São Paulo, Brasil

⁹Riohex 2%, Rioquímica Indústria Farmacêutica, São José do Rio Pret, Brasil

¹⁰Alphacaína 1:100, DFL Industria e Comercio S/A, Rio de Janeiro, Brasil

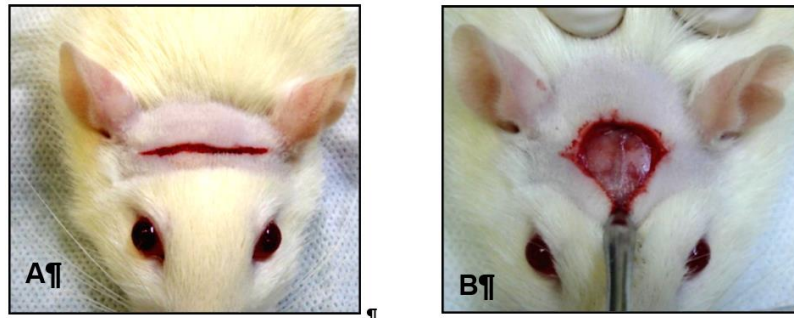


Figura 3 - A) Incisão dermoperiosteal coronal, após tricotomia. B) Descolamento do periósteo e exposição da calvária.

Fonte: Dados da pesquisa PPGCO/UFES, 2015.

Duas cavidades medindo 5mm de diâmetro, uma direita e outra esquerda, foram confeccionadas nos ossos parietais, lateralmente à sutura sagital mediana (**Figura 4** e **Figura 5B**), medidas com o auxílio de um paquímetro metálico analógico. Estes defeitos ósseos foram confeccionados com broca multilaminada em formato de pera, com maior diâmetro de 5 mm (**Figura 5A**), correspondente ao tamanho dos defeitos ósseos, montadas em peça de mão reta, com auxílio de um motor elétrico em baixa rotação. A broca foi pressionada levemente com movimentos intermitentes no sentido superoinferior, sob irrigação constante com soro fisiológico a 0,9%, com rompimento das corticais externa e interna da calvária, sem lesar as meninges. A diploe de um rato com 90 dias tem aproximadamente 1 a 1,5mm de espessura.

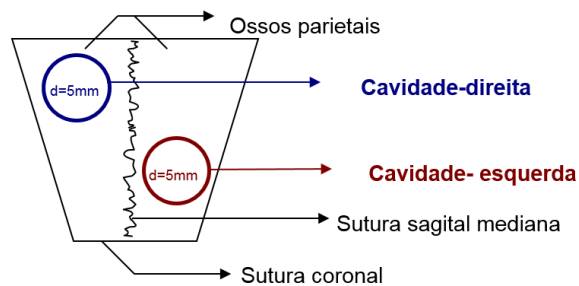


Figura 4 - Representação esquemática da calvária do rato. Defeitos ósseos de 5mm de diâmetro (d) (cavidades direita e esquerda), confeccionados nos ossos parietais.

Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2015.

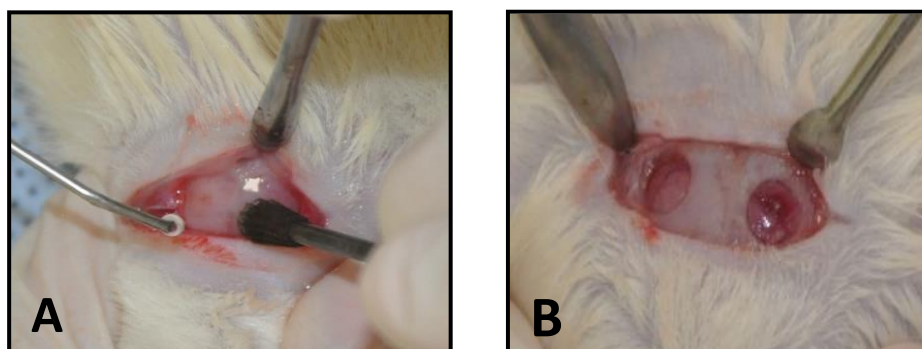


Figura 5 - A) Confeção das cavidades ósseas utilizando broca multilaminada em forma de pera, em baixa rotação, sob irrigação com soro fisiológico. B) Cavidades ósseas direita e esquerda confeccionadas nos ossos parietais a cada lado da sutura sagital mediana.

Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2015.

Após a confecção das cavidades, essas foram irrigadas abundantemente com solução fisiológica 0,9%, para remoção dos resíduos gerados no processo de confecção dos defeitos e secadas com gaze estéril. As substâncias foram inseridas nas cavidades de acordo com os grupos (Quadro 1):

Grupo A (GA =ALN 0,5%): 09 cavidades ósseas (do lado direito) foram preenchidas com ALN manipulado na concentração de 1,6 mg/L (0,5% ou 5mg/mL) pela Pharmácia Specifica Ltda., Bauru-SP, Brasil (ANEXO B) (**Figura 6A**). Uma esponja de gelatina reabsorvível estéril (Gelita Spon®, Gelita® Medical¹¹, Amesterdan, Holanda, 125X80X1mm) (**Figura 6B**) foi utilizada como veículo e para manutenção do ALN na cavidade óssea. A esponja possui 1mm de espessura e foi recortada em discos de 5mm de diâmetro. Os discos foram embebidos em 0,15mL da solução de ALN e inseridos nas cavidades (**Figura 6C**).



Figura 6 - A) Solução de ALN 0,5%; B) Esponja de gelatina reabsorvível, utilizada como veículo para inserção do alendronato de sódio na cavidade óssea; C) Disco de esponja de gelatina de 5mm embebido na solução de ALN.

Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2015.

Grupo B (GB= Bio-Oss®): osso bovino liofilizado marca Bio-Oss® (fabricante Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland) (**Figura 7**), na granulação fina (0,25 a 1mm) foi inserido em cavidades do lado direito de 09 animais. Após umidificado com solução salina, o biomaterial foi inserido delicadamente de forma que não fosse comprimido excessivamente e mantivesse espaço suficiente para a formação de novo osso (**Figura 8A**). A inserção do material foi realizada através de cureta alveolar de Lucas.

¹¹<http://www.gelitamedical.com>



Figura 7 - A) Grânulos de Bio-Oss®0.25-1.0mm e B) respectiva embalagem com especificações.
Fonte: web - www.geistlich.com.br

Grupo AB (GAB = Bio-Oss® + ALN 0,5%): os grânulos de Bio-Oss® foram embebidos em 0,15mL solução de ALN e inseridos nas cavidades ósseas do lado esquerdo de 09 animais;

Grupo C (GC = Controle/Coágulo sanguíneo): no grupo controle não foram inseridas substâncias, as cavidades do lado esquerdo de 09 animais foram preenchidas com coágulo sanguíneo autógeno proveniente do próprio leito cirúrgico (**Figura 8A**).

Os tecidos foram reposicionados, tomando-se os devidos cuidados para que o periósteo revestisse as cavidades, e o tecido cutâneo suturado com fio nylon 5-0¹² (**Figura 8B**), com pontos simples interrompidos, com o auxílio de um porta-agulha Mayo Hegar e uma pinça Adson Brown.

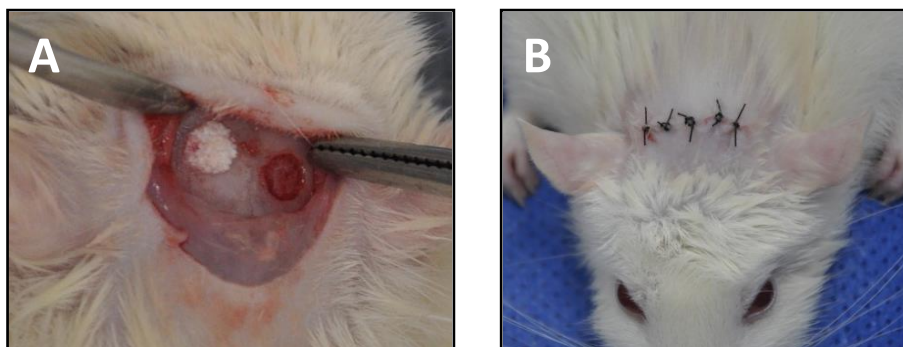


Figura 8 - A) Cavidade óssea direita preenchida com grânulos de Bio-Oss® e cavidade esquerda sem material (coágulo sanguíneo). B) Sutura com pontos isolados utilizando fio nylon 5-0.
Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2015.

A região foi limpa com gaze umedecida em soro fisiológico, para remoção dos resíduos de sangue, e os animais foram colocados na posição de decúbito ventral

¹²<http://www.gelitamedical.com>

em suas gaiolas correspondentes, para recuperação da anestesia. Para controle da dor pós-operatória, foi administrado Paracetamol Gotas 200mg/Kg¹³, via oral, imediatamente após o término do procedimento e por mais três dias, sendo adicionado ao recipiente de água de beber dos animais.

4.5 MORTE DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS PEÇAS OPERATÓRIAS

Alcançado o período de observação pós-operatório de 90 dias, os animais foram mortos por meio de dose letal de cloridrato de Xilazina® 15mg/kg a 30mg/kg e cloridrato de Ketamina® 150mg/kg a 225mg/kg de peso do animal.

Para obtenção da peça operatória foi realizada uma incisão na região mais posterior dos tecidos moles da cabeça, com de lâmina de bisturi n.º15, montada em cabo Bard-Parker n.º3, com o intuito de não danificar a região óssea de interesse. O tecido mole sobre a calvária foi removido com o auxílio de tesoura Metzenbaum e pinça Adson Brown, promovendo uma ampla visualização da calvária, incluindo os ossos parietais. Seguiu-se com a remoção dos ossos parietais contendo a área em regeneração óssea, por meio de osteotomia, utilizando-se uma broca tronco-cônica n. 701, em baixa rotação e sob irrigação constante de solução fisiológica a 0,9%. A linha de osteotomia respeitou uma distância de 4 a 5 mm da área dos defeitos. Realizadas as quatro linhas de osteotomia em torno dos defeitos ósseos, a parte de interesse na calvária foi removida com o auxílio de um descolador de Molt e uma pinça Adson Brown. Após exame macroscópico local, as peças operatórias foram imediatamente armazenadas em recipientes plásticos, com a finalidade de evitar as alterações *post mortem* dos tecidos. Este material identificado foi mergulhado em formalina neutra tamponada a 10%, para fixação e conservação.

Os animais foram descartados em sacos plásticos e enviados para incineração, conforme protocolo do Biotério da UFES.

¹³Tylenol®, Janssen-Cilag Farmacêutica LTDA., São José dos Campos - SP

4.6 CONFECÇÃO DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS

Após fixados em formol tamponado a 10%, os espécimes foram lavados abundantemente em água corrente por um período de 6 horas, e iniciou-se o processo de descalcificação em ácido nítrico a 5% por um período de 48 a 72 horas. Após o período de descalcificação, os espécimes foram colocados em solução de sulfato de sódio a 5% para neutralização do efeito do ácido nítrico. Em seguida, os espécimes foram lavados novamente em água corrente, e armazenados em álcool 70% para posterior processamento histológico.

Cada calvária foi então seccionada ao longo da sutura parietal, dividindo os blocos em lado direito e lado esquerdo, cada lado contendo um defeito ósseo (**Figura 9A**). Estes defeitos foram então seccionados parassagitalmente, ao longo de seu maior diâmetro, obtendo-se duas metades de cada cavidade em regeneração (**Figura 9B**).

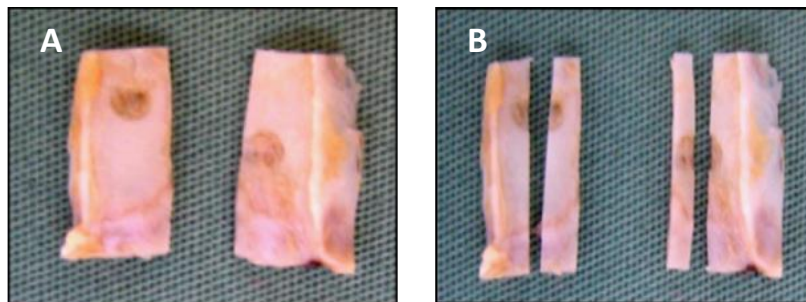


Figura 9 - Preparo das peças para inclusão em parafina. A) Corte longitudinal separando as cavidades entre si. B) Corte longitudinal dos defeitos ao longo de seus maiores diâmetros.

Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2015.

As peças foram identificadas e armazenadas em álcool 70%, transferidas para o aparelho processador automático de tecidos (Lupetec modelo PT 05, São Carlos/SP, Brasil)¹⁴ onde o material foi submetido a banhos sequenciais nos reagentes descritos abaixo:

- Álcool 70: 1 hora
- Álcool 80: 1 hora
- Álcool 90: 1 hora
- Álcool 100 I: 1 hora
- Álcool 100 II: 1 hora

¹⁴<http://www.lupetec.com.br>

- Álcool 100 III: 1 hora
- Álcool/ xilol 1/1: 1 hora
- Xilol I: 1 hora
- Xilol II: 1 hora
- Xilol III: 1 hora
- Parafina I: 1 hora e 30 minutos
- Parafina II: 30 minutos

Cada espécime foi então submetido ao 3º banho de parafina por 30 minutos e incluído em blocos utilizando parafina de inclusão.

Realizou-se a microtomia dos espécimes na espessura de 07 micrômetros (Micrótopo LEICA, modelo RM2125 RTS, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha)¹⁵, em cada hemicavidade. Duas secções de 07 micrometros na área de maior diâmetro do defeito, paralelas ao corte parassagital foram retiradas em cada bloco de parafina, sendo uma delas utilizadas para análise histomorfométrica (a que melhor representasse as estruturas teciduais).

Após um período de 24 horas na estufa a 40°C, realizou-se a coloração das lâminas através da técnica de hematoxilina-eosina (HE), conforme descrito abaixo:

- Desparafinação através de 3 banhos em xilol, 1 banho em álcool/xilol 1:1, 2 banhos em álcool absoluto e 1 banho em álcool 96°, sendo cada banho de 3 minutos;
- Hidratação do material com banho em água corrente por 5 minutos;
- Coloração em hematoxilina de Harris por 5 minutos;
- Procedeu-se à diferenciação do material mergulhando-o rapidamente em solução de álcool-ácido (100 mL de álcool 95° e 5 gotas de ácido clorídrico);
- Lavagem em água corrente por 10 minutos;
- Coloração em eosina de Lison por 2 minutos;
- Retirada do excesso de corante lavando rapidamente em água;
- Desidratação e montagem do material através de 1 banho em álcool 96° e 2 banhos em álcool 100, sendo cada banho por 1 minuto;

¹⁵www.leica-microsystems.com

- 1 banho em álcool/xilol 1:1 e 3 banhos em xilol sendo cada banho de 3 minutos;
- Montagem do corte na lâmina de vidro utilizando DPX e coberto com lamínula de vidro.

4.7 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

A captura das imagens das lâminas histológicas foi realizada com auxílio de fotomicroscópio óptico (Primo Star, Zeiss)¹⁶, com objetiva de 10 vezes de magnificação acoplada a uma câmera fotográfica AxioCam ERc5s, disponibilizados pelo Laboratório de Patologia Molecular/UFES (**Figura 10**).



Figura 10 - Fotomicroscópio óptico Primo Star Zeiss com câmera acoplada AxioCam ERc5s.
FONTE: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2015.

Apesar de ter sido utilizada na objetiva de 10X do fotomicroscópio, devidos às dimensões do defeito ósseo, não foi possível fazer a captura de toda a extensão da imagem em uma única fotomicrografia, portanto foram obtidas de 5 a 10 imagens de cada lâmina histológica, montadas de forma que representasse o defeito total (**Figura 11**), utilizando o *software Microsoft Powerpoint for mac 2011 version 14.3.9*, e transferidas posteriormente para o *software AutoCAD® 2010*, no qual foi realizado a análise histomorfométrica.

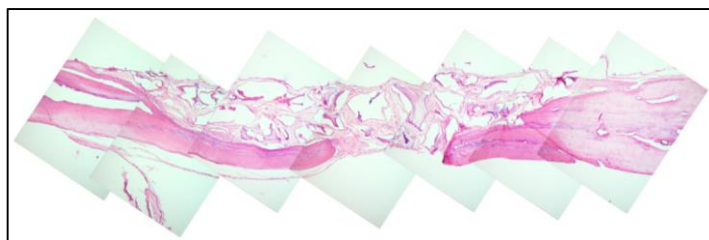


Figura 11 - Montagem das imagens para obtenção de todo o defeito ósseo.
Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2015.

¹⁶<http://www.zeiss.com.br/microscopy>

Com o emprego do AutoCAD®¹⁷ foram obtidas as seguintes medidas em cada imagem (**Figura 12 e Figura 13**): área total do defeito ósseo, área de osso neoformado, área de tecido conjuntivo (incluindo tecido fibroso, vasos sanguíneos, tecido adiposo), e área de grânulos de Bio-Oss®.

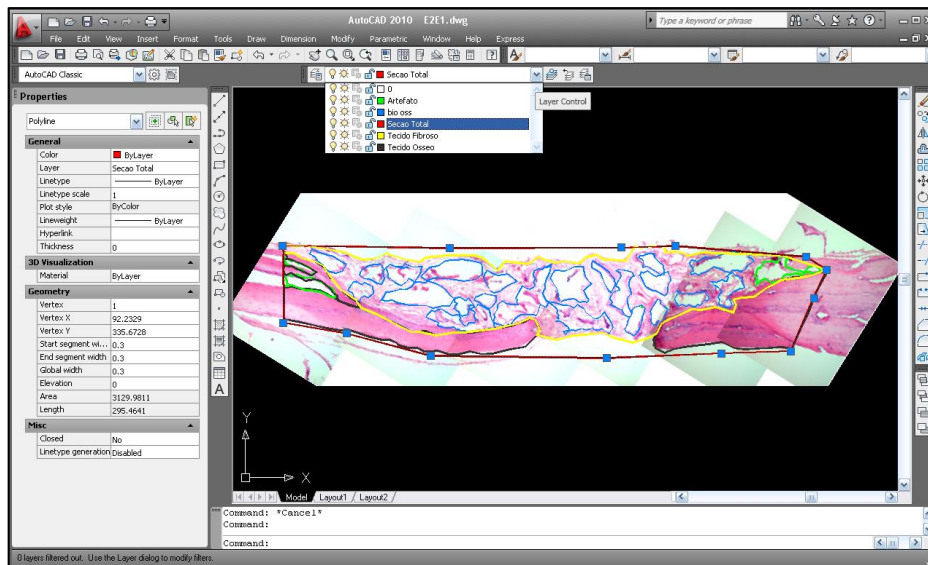


Figura 12 - Histomorfometria com auxílio do AutoCAD®: área total do defeito (linha vermelha), do osso neoformado (linha preta), do tecido conjuntivo (linha amarela) e dos grânulos de Bio-Oss® (linha azul), no defeito ósseo do grupo AB (Alendronato 0,5%+Bio-oss®).

Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2015.

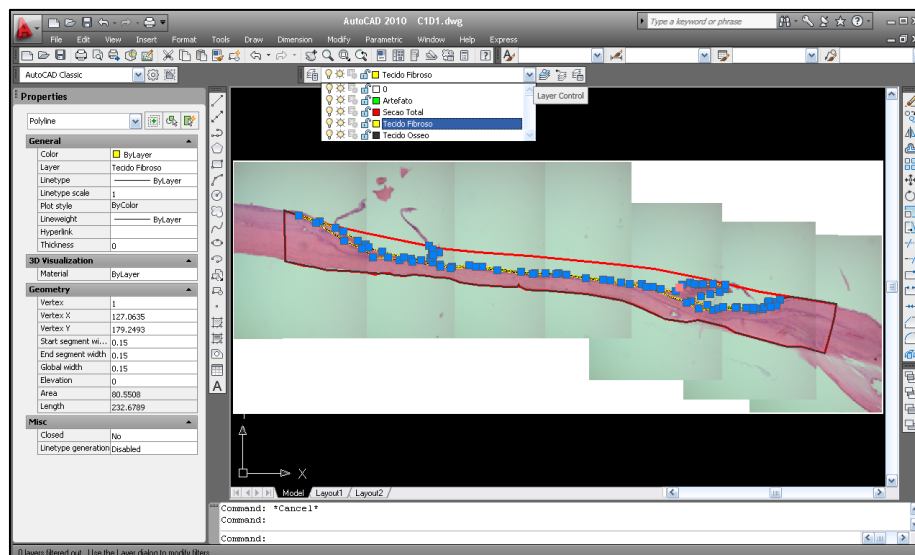


Figura 13 - Histomorfometria com auxílio do AutoCAD®: área total do defeito (linha vermelha) tecido ósseo neoformado (linha preta) tecido conjuntivo (pontos azuis ligados pela linha amarela), no defeito ósseo do grupo controle.

Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2015.

¹⁷ Assessoria AutoCAD® - Engenheiro electricista e Arquiteto Leonardo Bof Loureiro.

As áreas de artefatos ósseos foram excluídas das áreas totais dos defeitos, quando existentes. A partir da medida das áreas de cada animal, foram obtidas as médias das referidas áreas para cada grupo e calculados o percentual de osso neoformado, como se segue:

$$\% \text{ de osso neoformado} = \frac{\text{Média da área de osso neoformado}}{\text{Média da área total do defeito}} \times 100$$

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística¹⁸ deste trabalho foi realizada através de medidas de amplitude, tendência central, variabilidade.

Nas comparações das porcentagens de osso neoformado, de tecido fibroso e de grânulos de Bio-Oss® remanescente entre os grupos, foi aplicado o teste *t* de Student para amostras independentes (“STUDENT”, 1908). O teste *t* compara dois grupos, calcula a diferença entre cada conjunto de pares e analisa se estas diferenças são significativas (MOTTA; WAGNER, 2003). O nível de significância utilizado foi de 5% e intervalo de confiança de 95%.

O *software* estatístico utilizado nas análises foi o IBM SPSS® *Statistics version 21*.

¹⁸ Consultor e assessor estatístico: Elton Netto Sperandio.

5 RESULTADOS

Os resultados estão apresentados na forma de descrição das lâminas histológicas, realizada com supervisão de Patologista Bucal experiente¹⁹ e de representação estatística decorrente da análise histomorfométrica.

5.1 RESULTADOS HISTOLÓGICOS DESCRITIVOS

5.1.1 Grupo controle (GC) - Coágulo sanguíneo

No grupo controle, as imagens da área do defeito evidenciam áreas de osso neoformado imaturo, distribuído de forma regular e recoberto superiormente por tecido conjuntivo fibroso. Nas áreas do osso neoformado, observa-se osteócitos em suas lacunas (40X), dispostos de maneira bem distribuída (**Figura 14**).

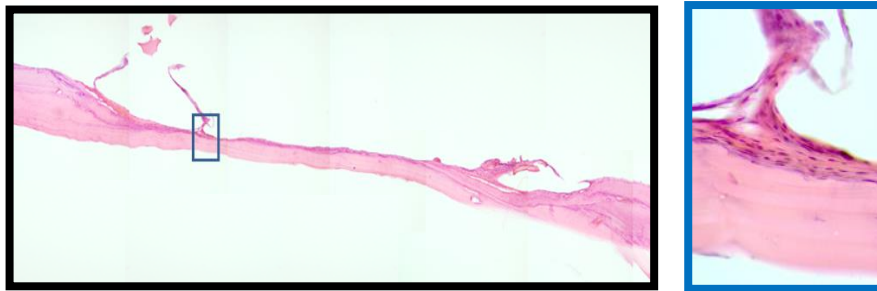


Figura 14: Fotomicrografia do defeito ósseo no grupo controle mostrando áreas de tecido ósseo neoformado (ON) circundada por tecido conjuntivo (TC) altamente celular e osteócitos (OC) enclausurados em suas respectivas lacunas (HE, Aumento 10X/40X).

Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2015.

5.1.2 Grupo A (GA) - ALN 0,5%

Os defeitos ósseos preenchidos por esponja de gelatina embebida em ALN 0,5% mostram áreas de neoformação óssea, com maior concentração de osteócitos na região superior do defeito, enquanto a região inferior voltada para as meninges observa-se menor quantidade (40X), o tecido conjuntivo presente, ocupa pequena área no defeito, e a maior parte está sobre o osso neoformado. No limite do defeito

¹⁹ Profa. Dra. Líliliana Aparecida Pimenta de Barros – CRO-ES 5596.

observa-se uma linha nítida basofílica, caracterizando a linha de reversão (setas). (Figura 15A e B).

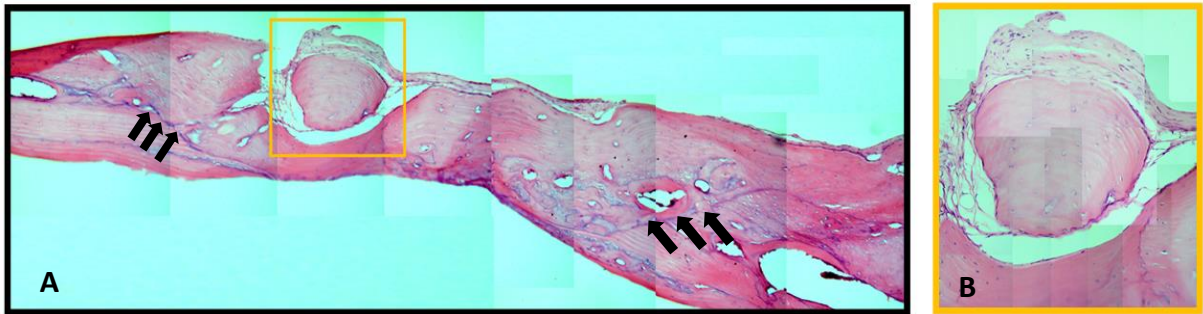


Figura 15A e B: Fotomicrografia do defeito ósseo do grupo A (Alendronato 0,5%), mostrando área de osso neoformado (ON), na superfície interna, e superiormente circunscrita por tecido conjuntivo fibroso (TC). Nota-se a presença de osteócitos aprisionados em suas lacunas (HE, Aumento 10X e 40X). Nota-se osso neoformado maduro (Aumento 40X, B). No limite do defeito observa-se uma linha nítida basofílica, caracterizando a linha de reversão (setas).

Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2015.

5.1.3 Grupo B - Bio-Oss®

Os defeitos ósseos preenchidos com Bio-Oss® evidenciam áreas de osso neoformado imaturo, revelada pela presença de osteócitos (40X), as áreas de ON e grânulos de Bio-Oss® remanescentes estão circundados por tecido conjuntivo altamente celular (Figura 16A e B).

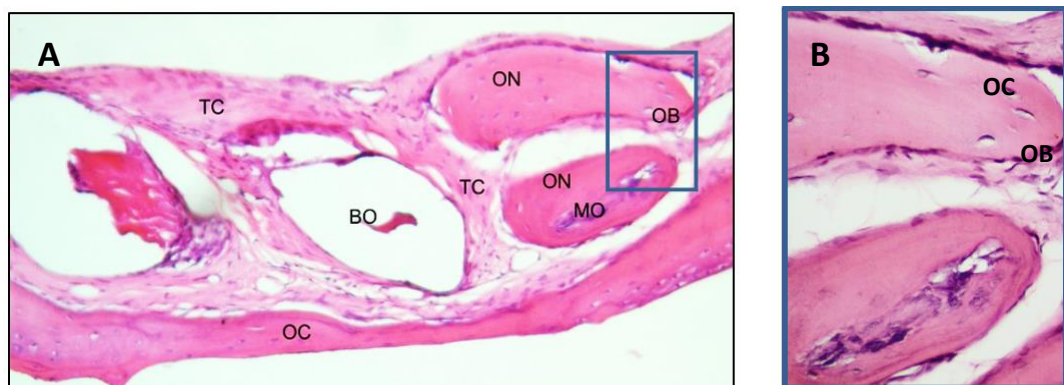


Figura 16A e B: Fotomicrografia do defeito ósseo do grupo B (Bio-Oss®), evidenciando áreas de osso neoformado (ON) com osteócitos (OC), áreas remanescentes dos grânulos de Bio-Oss® (BO) circundado por tecido conjuntivo fibroso altamente celular (TC) (HE, em A aumento de 10X e, em B aumento de 40X).

Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2015.

5.1.4 Grupo AB (GAB) - ALN 0,5%+ Bio-Oss®

As imagens histológicas do GAB mostram grânulos de Bio-Oss® remanescentes no interior do defeito ósseo e espaços negativos dos grânulos, a periferia destes espaços é constituída por tecido ósseo imaturo, entremeado com tecido conjuntivo fibroso altamente celular (**Figura 17A a D**).

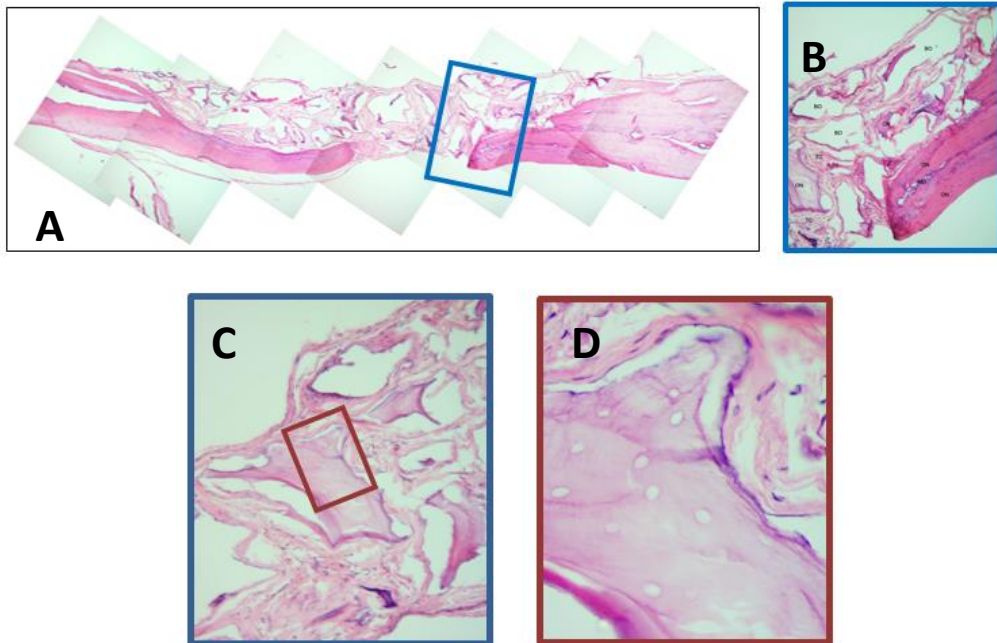


Figura 17A a D: Fotomicrografia do defeito ósseo do GAB (Alendronato 0,5% + Bio-Oss®). Observa-se áreas preenchidas pelo Bio-Oss® (BO) remanescente, assim como espaços negativos deixados pelos grânulos de BO; evidenciada por estreitas faixas de osso recém formado, circundadas por áreas de tecido conjuntivo (TC). (HE, Aumentos: em A de 4X em B e C de 10X e em D de 40X).

Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2015.

5.2 RESULTADOS ESTATÍSTICOS

A caracterização da amostra está expressa na Tabela 1 que reúne os resultados estatísticos descritivos (valor mínimo, máximo, média e desvio-padrão) em percentual (%) de todos os valores obtidos de osso neoformado, tecido conjuntivo e grânulos remanescentes de Bio-oss® (quando presentes), em todos os grupos.

Tabela 1 - Caracterização da amostra, estratificada por grupo e tipo de tecido observado ou material remanescente. Vitória/ES, Brasil (2015).

| Variável Grupo | Osso neoformado | | | Tecido conjuntivo | | | Bio-Oss® remanescente | | |
|-------------------|-----------------|---------|-------------|-------------------|---------|-------------|--------------------------|---------|------------|
| | Mín (%) | Máx (%) | M (%) ±DP | Mín (%) | Máx (%) | M (%) ± DP | Mín (%) | Máx (%) | M (%) ± DP |
| GA | 11,3 | 73,1 | 40,4 ±22,2 | 3,8 | 46,0 | 18,0 ± 13,6 | - | - | - |
| GAB | 9,8 | 66,6 | 29,9 ± 17,8 | 0,8 | 74,0 | 24,8 ± 21,8 | 1,6 | 25,1 | 12,2 ± 7,2 |
| GB | 15,2 | 88,0 | 46,0 ± 22,0 | 9,8 | 62,6 | 32,8 ± 20,6 | 4,1 | 16,4 | 9,2 ± 4,5 |
| GC | 19,0 | 69,1 | 49,9 ± 16,4 | 3,8 | 33,4 | 13,7±8,7 | - | - | - |

M = Média; DP= Desvio-padrão; GA= Grupo A; GB=Grupo B; GAB= Grupo AB; GC = Grupo Controle; Min = limite mínimo do intervalo de confiança; Máx = limite máximo do intervalo de confiança.

Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2015.

A seguir estão descritas as comparações entre os grupos das médias percentuais das áreas de osso neoformado, tecido conjuntivo e grânulos remanescentes de Bio-Oss® (quando presentes), bem como entre o volume tecidual total decorrente da soma dos percentuais dos componentes que preenchem o defeito.

5.2.1 Grupo A (ALN 0,5%) X Grupo Controle (Coágulo Sanguíneo)

A média do percentual de osso neoformado no GA foi de 40,4 ± 22,2%, enquanto no GC correspondente foi de 49,9 ± 16,4%, mostrando que houve menor formação de osso quando inserida esponja de gelatina embebida em solução de ALN 0,5% na cavidade óssea, em comparação ao grupo controle, na qual a cavidade foi preenchida por coágulo sanguíneo proveniente do leite cirúrgico. Porém, o teste *t* de Student evidenciou semelhança entre as médias de percentual de osso neoformado entre estes grupos ($p = 0,318$). O percentual de tecido conjuntivo no GA foi de 18,0 ± 13,6%, enquanto no GC o percentual de tecido conjuntivo foi de 13,7 ± 8,7%. Da mesma forma, a diferença não foi significativa entre as percentagens médias do tecido conjuntivo ($p = 0,431$). O volume tecidual total no grupo GC (63,6 ± 10,7%) é, em média, um pouco maior que no GA, também sem significância estatística ($p = 0,554$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Percentual de osso neoformado e tecido conjuntivo, no reparo ósseo de calvária de ratos no período de 90 dias pós-operatórios – Grupo A (ALN 0,5%) em comparação com o GC (coágulo sanguíneo). Vitória/ES, Brasil (2015).

| Variável \ GRUPO | GA (ALN 0,5%) | GC (Coágulo sanguíneo) | p |
|------------------------------|------------------|---------------------------|-------|
| | M ± DP (%) | M ± DP (%) | |
| Osso neoformado | 40,4 ± 22,2 | 49,9 ± 16,4 | 0,318 |
| Tecido conjuntivo | 18,0 ± 13,6 | 13,7 ± 8,7 | 0,431 |
| Volume tecidual total | 58,4 ± 23,2 | 63,6 ± 10,7 | 0,554 |

M = Média; DP= Desvio-padrão; GA= Grupo A; ALN = alendronato de sódio; GC = Grupo Controle, p=probabilidade de erro (estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$).

FONTE: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2015.

5.2.2 Grupo B (BIO-OSS®) X Grupo Controle (Coágulo Sanguíneo)

No GB, o tecido conjuntivo ocupou $32,8 \pm 20,6\%$ da área de reparo ósseo, enquanto no GC esta área foi menor, $13,7 \pm 8,7\%$, sendo a diferença estatisticamente significativa ($p = 0,021$). A média do percentual de osso neoformado foi de $46,0 \pm 22\%$ para o GB, enquanto que no GC a quantidade de novo osso foi ligeiramente maior ($49,9 \pm 16,4\%$), mas sem significância estatística ($p = 0,675$). Observa-se que, ao final do experimento, os grânulos de Bio-Oss® preenchem, em média, $9,2 \pm 4,5\%$ da área do defeito ósseo. Dessa forma, nota-se maior volume de tecido ocupando a cavidade experimental ($88 \pm 28,8\%$) do que no CG ($63,6 \pm 10,7\%$), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,030$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Percentual de osso neoformado e tecido conjuntivo no reparo ósseo em calvária de ratos no período de 90 dias pós-operatórios – GB (BIO-OSS®) X GC (coágulo sanguíneo). Vitória/ES, Brasil (2015).

| Variável \ Grupo | GB (BIO-OSS®) | GC (Coágulo sanguíneo) | p |
|------------------------------|------------------|---------------------------|---------------|
| | M ± DP (%) | M ± DP (%) | |
| Osso neoformado | 46,0 ± 22,0 | 49,9 ± 16,4 | 0,675 |
| Tecido conjuntivo | 32,8 ± 20,6 | 13,7 ± 8,7 | 0,021* |
| Bio-Oss® remanescente | 9,2 ± 4,4 | - | - |
| Volume tecidual total | 88,0 ± 28,8 | 63,6 ± 10,7 | 0,030* |

M = Média; DP = Desvio-padrão; GB = Grupo B; GC = Grupo Controle; p = probabilidade de erro. *Diferença estatisticamente significativa para $p \leq 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2015.

5.2.3 Grupo AB (BIO-OSS® + ALN 0,5%) X Grupo Controle (Coágulo Sanguíneo)

Quando comparadas as médias de neoformação óssea entre o GAB ($29,9 \pm 17,8\%$) e o GC ($49,9 \pm 16,4\%$), verificou-se maior neoformação óssea no GC, sendo a diferença estatisticamente significativa ($p = 0,025$). Aos 90 dias pós-operatórios, as cavidades no GAB ainda se apresentavam preenchidas em média com $12,2\% \pm 7,2\%$ de remanescentes de grânulos de Bio-Oss®. Quanto ao percentual de tecido conjuntivo, no GAB foi de $24,8 \pm 21,8\%$, enquanto no GC foi de $13,7 \pm 8,7\%$, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,175$). O volume tecidual total foi percentualmente maior no GAB ($66,9 \pm 24,0\%$) que o do CG ($63,6 \pm 10,7\%$), porém estatisticamente semelhante, com $p = 0,708$ (Tabela 4).

Tabela 4 - Percentual de osso neoformado, tecido conjuntivo e Bio-Oss® remanescente no reparo ósseo em calvária de ratos no período de 90 dias pós-operatórios – GAB (BIO-OSS®+ ALN 0,5%) X GC (coágulo sanguíneo). Vitória/ES, Brasil (2015).

| Variável | Grupo AB (BIO-OSS® + ALN 0,5%) | GC (Coágulo sanguíneo) | p |
|-----------------------|-----------------------------------|---------------------------|--------|
| | M ± DP (%) | M ± DP (%) | |
| Osso neoformado | 29,9 ± 17,8 | 49,9 ± 16,4 | 0,025* |
| Tecido conjuntivo | 24,8 ± 21,8 | 13,7 ± 8,7 | 0,175 |
| Bio-Oss® remanescente | 12,2 ± 7,2 | - | - |
| Volume tecidual total | 66,9 ± 24,0 | 63,6 ± 10,7 | 0,708 |

M = Média; DP = Desvio-padrão; GAB = Grupo AB; GC = Grupo Controle; p = probabilidade de erro. *diferença estatisticamente significativa para $p \leq 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2015.

5.2.4 Grupo B (BIO-OSS®) X Grupo AB (BIO-OSS®+ ALN 0,5%)

O percentual médio de neoformação óssea no grupo que recebeu Bio-Oss® isolado (GB) foi de $46,0 \pm 22,0\%$, enquanto que no grupo que recebeu a associação Bio-Oss® + ALN 0,5% (GAB), o percentual de neoformação óssea foi de $29,9 \pm 17,8\%$. Observa-se ainda que a quantidade de Bio-Oss® remanescente no grupo GAB foi

de $12,2 \pm 7,2\%$, enquanto no GB este percentual foi de $9,2 \pm 4,5\%$. Quanto ao tecido conjuntivo, o percentual observado no grupo GB foi de $32,8 \pm 20,6\%$, enquanto no GAB foi de $24,8 \pm 21,8\%$. Ao quantificar o preenchimento tecidual total nas distintas cavidades, foi verificado que as cavidades preenchidas somente pelo BIO-OSS®, no final do tempo experimental estavam com $88 \pm 28,8\%$ de volume, enquanto as cavidades preenchidas pela associação de BIO-OSS® e ALN 0,5% tinham em torno de $66,9\%$, em média. Observe na Tabela 5 que, aplicando o teste “t” estas diferenças não são significativas ($p > 0,05$).

Tabela 5 - Percentual de osso neoformado e tecido conjuntivo no reparo ósseo em calvária de ratos no período de 90 dias pós-operatórios – GAB (BIO-OSS®+ ALN 0,5%) X GB (BIO-OSS®). Vitória/ES, Brasil (2015).

| Variável \ GRUPO | GB (BIO-OSS®) | Grupo AB (BIO-OSS®+ ALN 0,5%) | p |
|-----------------------|------------------|----------------------------------|-------|
| | M ± DP (%) | M ± DP (%) | |
| Osso neoformado | 46,0 ± 22,0 | 29,9 ± 17,8 | 0,107 |
| Tecido conjuntivo | 32,8 ± 20,6 | 24,8 ± 21,8 | 0,438 |
| Bio-Oss® remanescente | 9,2 ± 4,5 | 12,2 ± 7,2 | 0,310 |
| Volume tecidual total | 88,0 ± 28,8 | 66,9 ± 24,0 | 0,111 |

M = Média; DP = Desvio-padrão; GB = Grupo B; GAB = Grupo AB. p = probabilidade de erro (estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2015.

5.2.5 Grupo A (ALN 0,5%) X Grupo AB (BIO-OSS®+ ALN 0,5%)

A quantidade de osso neoformado no GA apresenta média percentual de $40,4 \pm 22,2\%$, maior que a observada no GAB ($29,9 \pm 17,8\%$), porém esta diferença não é estatisticamente significativa ($p=0,285$). Já o percentual de tecido conjuntivo no GAB foi maior ($24,8 \pm 21,8\%$) que no GA ($18,0 \pm 13,6\%$), sendo as médias consideradas semelhantes estatisticamente ($p = 0,440$). Observa-se que no grupo GAB, as cavidades ainda se encontram em média $12,2 \pm 7,2\%$ com remanescentes de Bio-Oss®, conferindo maior volume tecidual total a este grupo ($66,9 \pm 24,0\%$), mas sem significância estatística em relação ao GA ($58,4 \pm 23,2\%$), cujo $p = 0,456$ (Tabela 6).

Tabela 6 - Percentual de osso neoformado e tecido conjuntivo no reparo ósseo em calvária de ratos no período de 90 dias pós-operatórios – GAB (BIO-OSS® + ALN 0,5%) em comparação com o GA (ALN 0,5%). Vitória/ES, Brasil (2015).

| Variável | Grupo | | p |
|------------------------------|---------------|-------------------------------|-------|
| | GA (ALN 0,5%) | Grupo AB (BIO-OSS®+ ALN 0,5%) | |
| | M ± DP (%) | M ± DP (%) | |
| Osso neoformado | 40,4 ± 22,2 | 29,9 ± 17,8 | 0,285 |
| Tecido conjuntivo | 18,0 ± 13,6 | 24,8 ± 21,8 | 0,440 |
| Bio-Oss® remanescente | - | 12,2 ± 7,2% | - |
| Volume tecidual total | 58,4 ± 23,2 | 66,9 ± 24,0 | 0,456 |

M = Média; DP = Desvio Padrão; GAB = Grupo AB; ALN = Alendronato de sódio 0,5%; GA = Grupo Alendronato; p = probabilidade de erro (estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2015.

5.2.6 Grupo B (BIO-OSS®) X Grupo A (ALN 0,5%)

A média do percentual de osso neoformado encontrada no GB foi de $46,0 \pm 22\%$ e no GA este percentual foi de $40,4 \pm 22,2\%$, sendo esta diferença não estatisticamente significativa ($p = 0,600$). O tecido conjuntivo encontrado no GB ocupa, em média, $32,8 \pm 20,6\%$ da cavidade em reparo, enquanto no GA, o tecido conjuntivo preenche $18,0 \pm 13,6\%$ do defeito, também sem significância estatística ($p = 0,091$). No GB ao final do experimento, o Bio-Oss® preenche, em média, $9,2 \pm 4,5\%$ da cavidade óssea, contribuindo para um volume tecidual total significativamente maior no GB ($88,0 \pm 28,8\%$) quando comparado ao GA ($58,4 \pm 23,2\%$) ($p = 0,029$) (Tabela 7).

Tabela 7- Percentual de osso neoformado e tecido conjuntivo no reparo ósseo em calvária de ratos no período de 90 dias pós-operatórios – GB (BIO-OSS®) em comparação com o GA (ALN 0,5%). Vitória/ES, Brasil (2015).

| Variável | GRUPO | | p |
|------------------------------|---------------|---------------|--------|
| | GB (BIO-OSS®) | GA (ALN 0,5%) | |
| | M ± DP (%) | M ± DP (%) | |
| Osso neoformado | 46,0 ± 22,0 | 40,4 ± 22,2 | 0,600 |
| Tecido conjuntivo | 32,8 ± 20,6 | 18,0 ± 13,6 | 0,091 |
| Bio-Oss® remanescente | 9,2 ± 4,5 | - | - |
| Volume tecidual total | 88,0 ± 28,8 | 58,4 ± 23,2 | 0,029* |

M = Média; DP = Desvio Padrão; GB = Grupo B (BIO-OSS®); GA = Grupo A (Alendronato 0,5%); p = probabilidade de erro (estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2015.

6 DISCUSSÃO

A análise histomorfométrica tem sido empregada para avaliar o processo de reparo ósseo em diversos estudos experimentais (JAKOBSEN et al., 2007; SRISUBUT et al., 2007; BODDE et al., 2008; TOKER et al., 2012). É uma das técnicas mais utilizadas para estudar doenças metabólicas ósseas, pois permite que seja realizada a avaliação das alterações de remodelação óssea, avaliando de forma direta e precisa os mecanismos teciduais envolvidos (MAHL et al., 2009). No presente estudo, a análise histomorfométrica permitiu detectar a presença de osso no defeito e quantificar o tamanho da área de neoformação óssea, de tecido conjuntivo adjacente e a presença e área de grânulos do Bio-Oss®. A importância desse tipo de análise é confirmada nos estudos de Marzouk et al. (2007) e Eski et al. (2007) que relatam ser a análise quantitativa essencial para estudos que objetivam avaliar a efetividade de novas modalidades terapêuticas na neoformação óssea. O tecido conjuntivo, por sua vez, foi aqui quantificado para descartar os possíveis artefatos gerados pela técnica histológica, e contribuir para determinar o volume total da área do reparo, mostrando possíveis aumentos ou diminuição das suas dimensões.

Com o intuito de minimizar os efeitos colaterais da administração sistêmica e uso prolongado do ALN como esofagite, erosões, ulcerações (FLEISCH, 1998) e osteonecrose dos maxilares (MAAHS et al., 2011), o número de estudos sobre a ação e a efetividade de sua aplicação tópica tem sido cada vez mais crescente. Acredita-se que a aplicação local do medicamento evita a maioria desses efeitos, e ainda proporciona uma concentração local maior do que a obtida sistemicamente (YAFFE et al., 1997; KAWATA et al., 2004; SHARMA; PRADEEP, 2012a, b; TOKER et al., 2012). Möller et al. (2014) ainda acrescentam que os estudos que investigam o uso tópico de drogas surgem como uma forma de direcionamento da dose ótima de uma substância bioativa precisamente no local onde é desejada, em vez de se distribuir excessivamente e de forma desnecessária por todo o corpo, através da circulação sistêmica.

Os primeiros relatos sobre a ação local do ALN sobre a reabsorção óssea são de Yaffe et al. (1995). Os autores observaram que o ALN nas concentrações de 0,15;

0,75 e 1,5 mg não inibiu a reabsorção óssea ocasionada pela elevação de retalho mucoperiosteal. Em 1997, Yaffe et al., utilizando a mesma metodologia, porém aumentando a dose do ALN para 20mg, observaram redução estatisticamente significativa da reabsorção óssea alveolar. Jaime et al. (2005), entretanto, avaliaram o efeito tópico do ALN 20 mg/mL em esponja de colágeno em defeitos cirúrgicos e não encontraram diferenças entre o grupo tratado e o placebo, resultados semelhantes aos relatados de Yaffe et al. (1995). Por outro lado, Binderman e Yaffe (2000) analisando os efeitos do ALN (10, 50, 200 e 400 µg) veiculados em esponja de colágeno, verificaram efeito positivo na aplicação tópica e dose dependente, com redução significativa da perda óssea alveolar. Resultados favoráveis quanto ao reparo ósseo, foram também observados por Komatsu et al. (2008) nos quais o ALN 1mM aplicado topicamente reduziu de forma estatisticamente significativa a reabsorção óssea e radicular e estimulou a formação de osso ao redor de dentes reimplantados. A partir destes relatos, pode-se observar que a concentração ideal do ALN na inibição da reabsorção óssea e no aumento da neoformação óssea ainda não está bem estabelecida na literatura, com resultados distintos.

A concentração de 0,5% (5mg/mL) de ALN utilizada na presente pesquisa foi definida a partir de alguns trabalhos da literatura, sendo aplicada 0,15mL nas cavidades experimentais, ou seja, 0,75 mg/mL da solução. Gomes (2006) estudou a citotoxicidade de diferentes concentrações de ALN, e observou que os osteoblastos permaneceram viáveis quando as concentrações foram inferiores a 5mg/mL. Sharma e Pradeep (2012a, b), observaram aumento na formação óssea em pacientes com doença periodontal em concentrações ainda menores (10 µl do ALN 1% que equivale a 0,1mg/mL). Rocha (2013) testou duas concentrações de ALN (0,5 e 1%) adicionadas ao Bio-Oss® no preenchimento de defeitos ósseos em coelhos e observou, por meio de radiomicrografia, aumento de neoformação óssea mais significativo na menor concentração (0,5%).

Como pode ser visto na tabela 02, houve maior percentual de neoformação óssea no grupo controle (coágulo sanguíneo), que no uso do ALN 0,5% veiculado em esponja de colágeno (GA), porém esta diferença não foi estatisticamente significativa, mostrando semelhança entre os grupos. Yaffe et al. (1995) também usou a concentração de 0,75 mg/mL, cujos resultados foram semelhantes à do presente estudo. A partir dos resultados obtidos por radiomicrografia de alta resolução, os

autores observaram que não houve diferença estatisticamente significativa na inibição da reabsorção do osso alveolar exposto entre o grupo controle e o testado. Do mesmo modo, nos achados de Rocha (2013) por meio de radiomicrografia, o uso tópico da solução de ALN 0,5% em calvária de coelhos retardou o processo de reparo ósseo quando comparado ao grupo controle (coágulo sanguíneo), mas sem significância estatística. Ming ni et al. (2011) também observaram menor densidade óssea no grupo tratado com 250µg de ALN, demonstrando que este BF tem efeitos inibitórios na formação óssea, nesta concentração.

Cabe ressaltar que no delineamento do presente estudo as cavidades do grupo controle foram confeccionadas nos mesmos animais que receberam o Bio-Oss® na cavidade contralateral para que não houvesse interferência do possível efeito sistêmico do ALN aplicado localmente nestes grupos. Yaffe et al. (1999), utilizando esponja de gelatina embebida em 10µl de ALN topicamente no osso alveolar detectaram a substância no osso da tíbia, nos tecidos mole e ósseo do lado contralateral, indicando absorção sistêmica do ALN.

Os resultados do presente estudo mostram que no GB, no qual o Bio-Oss® foi utilizado isoladamente, não houve diferença no percentual de neoformação óssea quando comparados ao grupo controle (coágulo sanguíneo) (TABELA 03). Rocha (2013) encontrou maior percentual de osso neoformado no grupo Bio-Oss® do que no grupo controle (coágulo sanguíneo), porém, a autora realizou análise radiomicrográfica, na qual, devido à semelhança nos tons de cinza, o percentual de grânulos de Bio-Oss foi computado juntamente com o osso neoformado. Cabe ressaltar, que no presente estudo, no GB o percentual de tecido conjuntivo foi maior e estatisticamente mais significativo que no grupo controle, sugerindo que a presença do Bio-Oss® favorece a manutenção de tecido conjuntivo entre seus grânulos. Avaliar o processo de reparo em um maior período de observação, pode elucidar se o tecido conjuntivo adjacente aos grânulos de Bio-oss® sofrerá ou não substituição parcial ou total por tecido ósseo neoformado juntamente com os grânulos de Bio-oss®. A reabsorção da matriz óssea bovina e sua substituição por tecido ósseo é bastante discutida, pois tem sido relatado na literatura diferentes graus de reabsorção, especialmente quando se comparam os resultados de estudos experimentais em animais e humanos (HALMMAN et al., 2008). Alguns estudos mostram que o osso bovino é rapidamente substituído por osso neoformado quando

comparado a outros compostos de hidroxiapatita (WHEELER; HOLMES; CALHOUN, 1996), em outras pesquisas se observa um processo lento de reabsorção (DALAPICULA et al., 2006; SILVA et al., 2006). É notório que, após 90 dias de experimento, as cavidades experimentais ainda se encontram parcialmente preenchidas pelo enxerto ósseo (em média 9,2%), conferindo maior volume tecidual neste grupo ($88,0 \pm 28,8$) e estatisticamente mais significativo que no grupo controle.

Pouco estudos associando o Bio-Oss® com BFs estão descritos na literatura, de modo geral estes estudos mostram melhora na formação óssea devido ao aumento da percentagem de osso trabecular (HOUSHMAND et al., 2007; NOBRE, 2013; KIM et al. (2015); diminuição significativa do número de osteoclastos no osso regenerado (HOUSHMAND et al., 2007) e diminuição da reabsorção dos enxertos ósseos (MÖLLER et al., 2014). No presente estudo, quando o ALN 0,5% foi adicionado aos grânulos de Bio-Oss® e inseridos na cavidade (GAB), a neoformação óssea foi menor do que o grupo controle, sendo esta diferença estatisticamente significativa (Tabela 04). Rocha (2013) também utilizou o ALN 0,5 % associado ao Bio-Oss®, utilizando calvária de coelhos. Porém, seus resultados obtidos por radiomicrografias mostraram que esta associação acelerou o processo de reparo ósseo quando comparado ao osso bovino isoladamente, no entanto o Bio-oss® foi quantificado conjuntamente com o osso neoformado na imagem radiográfica. Resultados positivos também foram encontrados por Housmand et al. (2007) que observaram, por meio de histomorfometria, que adicionando o Pamidronato ao Bio-Oss® houve melhora das propriedades de osteocondução e regeneração deste material, houve maior neoformação óssea e redução do número de osteoclastos em defeitos criados em mandíbulas de ovelhas. Cabe enfatizar que o Apesar do GC ter uma formação óssea ($49,9 \pm 16,4\%$) maior e estatisticamente significativa que o GAB ($29,9 \pm 17,8\%$), os defeitos deste último ainda apresentam em média $12,2 \pm 7,2\%$ de Bio-Oss® e $24,8 \pm 21,8\%$ de tecido conjuntivo, que somados compreendem $66,9\%$ do defeito, maior, porém estatisticamente semelhante ao do grupo controle ($63,6\%$).

Como pode ser observado na Tabela 5, a adição de ALN 0,5% ao osso bovino resultou em menor reabsorção dos grânulos, porém sem significância estatística. Já nos estudos de Möller et al. (2014), esta redução foi estatisticamente significativa utilizando ALN (1mg/mL) associado ao Bio-Oss® em mandíbula de porcos. Entretanto, os autores evidenciaram sinais de osteonecrose na parte inferior dos

enxertos ósseos autógenos, sugerindo dose elevada do BF, e constataram a necessidade de melhor adaptação da dosagem. Rocha (2013) observou que o ALN (0,5 e 1%) adicionado ao Bio-Oss® acelerou o processo de reparo ósseo em calvária de coelhos quando comparado ao osso bovino isoladamente de forma estatisticamente significativa, sendo que na concentração de 0,5% promoveu maior percentual de reparo ósseo.

Ao se comparar o GA com o GAB (TABELA 06), observa-se que apesar de haver neoformação óssea maior no GA ($40,4 \pm 22,2$) que no GAB ($29,9 \pm 17,8$), esta diferença não é estatisticamente significativa. Achados semelhantes foram obtidos por KIM et al. (2015) por meio de análise histomorfométrica. Ao adicionarem o ALN a 1mM ou a 10mM ao Bio-Oss®, observaram aumento significativo de osso neoformado na menor dose, na 2ª e na 4ª semana de experimento; no entanto, após 8 semanas, essa diferença não foi estatisticamente significativa para ambas as doses, quando comparado ao Bio-Oss® isolado. Os autores mencionaram que o ALN a 1mM associado à rhBMP-2 e adicionado ao Bio-Oss® tem efeito sinérgico sobre a regeneração óssea, sendo isto resultante da diminuição da atividade do RANKL dos osteoblastos. Cabe enfatizar que, no presente estudo, os defeitos do GAB ainda apresentam em média $12,2 \pm 7,2\%$ de grânulos Bio-Oss® e $24,8 \pm 21,8\%$ de tecido conjuntivo, conferindo maior volume tecidual total (66,9%, em média) do que no GA (em média 58,4%), mas sem significância estatística.

De um modo geral, os autores buscam defender que o ALN, e outros BFs, reduzem a reabsorção óssea quando aplicado local ou sistemicamente (YAFFE et al., 1997; SCHENK et al., 1986). Seus efeitos biológicos são atribuídos principalmente a sua incorporação no osso, permitindo a interação direta com osteoclastos e osteoblastos através de uma variedade de processos bioquímicos, já mencionados (SATO et al., 1991; MASARACHIA et al., 1996; KAYNAK et al. 2000). Porém, resultados negativos que resultaram na diminuição da neoformação óssea também foram relatados, mas ainda não estão elucidados. Acredita-se que seja decorrente ao efeito citotóxico da dose em concentração elevada, necessitando de teste com a substância mais diluída (ROCHA, 2013; MÖLLER et al., 2014).

Os resultados decorrentes da adição do ALN ao osso bovino liofilizado (Bio-Oss®) encontrados neste e em outros estudos são ora promissores, e por vezes intrigantes.

As doses ainda são incertas e os resultados contraditórios. O número de pesquisas é restrito, necessitando de novas análises para consolidar os achados e possibilitar a utilização do ALN com maior segurança e previsibilidade na prática clínica.

7 CONCLUSÕES

- a) O uso do ALN 0,5% tópico isoladamente não alterou o percentual de neoformação óssea das cavidades confeccionadas em calvária de ratos;
- b) O ALN 0,5% adicionado ao osso bovino liofilizado (Bio-Oss®) diminuiu o percentual de neoformação óssea em relação ao coágulo sanguíneo, mas promoveu preenchimento tecidual da área do defeito de forma semelhante.
- c) Não houve diferença da neoformação óssea entre o uso do Bio-Oss® isolado ou com adição do ALN 0,5%;
- d) O ALN 0,5% adicionado ao osso bovino liofilizado (Bio-Oss®) não interferiu na reabsorção dos grânulos do enxerto.

REFERÊNCIAS²⁰

- ALTUNDAL, H. et al. Inhibitory effect of alendronate on bone resorption of autogenous free bone grafts in rats. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 65, n. 3, p. 508-16, 2007.
- ALTUNDAL, H.; GURSOY, B. The influence of alendronate on bone formation after autogenous free bone grafting in rats. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology**, v. 99, n. 3, p. 285-91, 2005.
- ASSAEL, L. Oral Bisphosphonates as a Cause of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws: Clinical Findings, Assessment of Risks, and Preventive Strategies. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 67, n. 5, p. 35-43, 2009.
- BINDERMAN, I. Bone and biologically compatible materials in dentistry. **Current Opinion in Dentistry**, v. 1, n. 6, p. 836-40, 1991.
- BINDERMAN, I.; ADUT, M.; YAFFE, A. Effectiveness of local delivery of alendronate in reducing alveolar bone loss following periodontal surgery in rats. **Journal of Periodontology**, v. 71, n. 8, p. 1236-40, 2000.
- BLOMQVIST, J. E. et al. Importance of bone graft quality for implant integration after maxillary sinus reconstruction. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology**, v. 86, n. 3, p. 268-74, 1998.
- BODDE, E. et al. No increased bone formation around alendronate or omeprazole loaded bioactive bone cements in a femoral defect. **Tissue Engineering**, v. 14, n. 1, p. 29-39, 2008.
- BOIVING, G.; MEUNIER, P. J. Effects of bisphosphonates on matrix mineralization. **Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions**, v. 2, n. 6, p. 538-43, 2002.
- CAMPBELL, D. T.; STANLEY, J. C. **Delineamentos experimentais e quase-experimentais de pesquisa**. São Paulo: EPU: Ed. da Universidade de São Paulo, 1979.
- COXON, F. P.; THOMPSON, K.; ROGERS, M. J. Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 3, p. 307-12, 2006.
- DALAPICULA, S. S.; VIDIGAL JUNIOR, G. M.; CONZ, M. B.; CARDOSO, E. S. Características físico-químicas dos biomateriais utilizados em enxertias ósseas. Uma revisão crítica. **Revista Implant news**, v.3, n. 5, p. 487-490, 2006.

²⁰ Normas de Padronização Bibliográfica seguindo os Requisitos da ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas – NBR 6023, de 30/08/2002, em vigor. Disponível em: <http://www.abntcolegao.com.br/ufes/grid.aspx>. Acesso em 16.11.2015.

ESKI, M. et al. Assessment of Distraction Regenerate Using Quantitative Bone Scintigraphy. **Annals of Plastic Surgery**, v. 58, n. 3, p. 328-34, 2007.

FLEISCH, H. Bisphosphonates: Mecanismos of Action. *Endocrine Reviews*, v. 19, n. 1, p. 80-100, 1998.

FROMIGUE, O.; BODY, J. J. Bisphosphonates Influence the proliferation and maturation of normal human osteoblasts. **Journal of Endocrinology Investigation**, n. 25, p. 539-46, 2002.

FROUM, S. J. et al. Sinus floor elevation using anorganic bovine bone matrix (OsteoGraf/N) with and without autogenous bone: a clinical, histologic, radiographic, and histomorphometric analysis--Part 2 of an ongoing prospective study. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 18, n. 6, p. 528-43, 1998.

GANGULI, A.; HENDERSON, C.; GRANT, M. H.; MEIKLE, S. T.; LLOYD, A. W.; GOLDIE, I. The interactions of bisphosphonates in solution and as coatings on hydroxyapatite with osteoblasts. **Journal of Material Science and Materials in Medicine**, v. 13, n. 10, p. 923-31, 2002.

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

HABIBOVIC, P. et al. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. **Biomaterials**, v. 26, n. 17, p. 3565-75, Jun 2005.

HALASY-NAGY, J. M.; RODAN, G. A.; RESZKA, A. A. Inhibition of bone resorption by alendronate and residronate does not require osteoclast apoptosis. **Bone**, v. 29, p. 553-9, 2001.

HALLMAN, M.; THOR, A. Bone substitutes and growth factors as an alternative/ complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. **Periodontology**, v. 47, p. 172-92, 2008.

HOUSHMAND, B. et al. Boosting effect of bisphosphonates on osteoconductive materials: a histologic in vivo evaluation. **Journal of Periodontology Research**, v. 42, n. 2, p. 119-123, 2007.

IM, G.I; QURESHI, S. A.; KENNEY, J. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. **Biomaterials**, v. 25, p. 4105-4115, 2004.

JAIME, A. *et al.* Influência da administração local de alendronato sódico no reparo ósseo em calvária de ratas ovariectomizadas. **Brazilian Dental Science**, v. 8, n. 2, p. 70-9, 2005.

JAKOBSEN, T. et al. Local Alendronate Increases Fixation of Implants Inserted with Bone Compaction: 12-Week Canine Study. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 25, p 432-41, 2007.

KANIS, J. A.; GERTZ, B. J.; SINGER. F.; ORTOLANI, S. Rationale for the use of

alendronate in osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 1995.

KAWATA, T. et al. Effect of ALN on osteoclast differentiation and bone volume in transplanted bone. **Experimental Animals**, v. 53, n.1, p. 47-51, 2004

KAYNAK, D. et al. A histopathological investigation on the effects of the bisphosphonate alendronate on resorptive phase following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. **Journal of Periodontology**, v. 71, n. 5, p. 790-6, 2000.

KIM, H. et al. Combined effect of bisfosfonate and recombinant human bone morphogenetic protein 2 bone healing of rat calvarial defects. **Maxillofacial Plastic and Reconstructive surgery**, v. 37, n. 1, p. 16-23, 2015.

KOMATSU, K. et al. Long-term effects of local pretreatment with alendronate on healing of replanted rat teeth. **Journal of Periodontology Research**, v 43, p. 194–200, 2008.

LASSETER, K. C.; PORRAS, A. G.; DENKER, A.; SANTHANAGOPAL, A.; DAIFOTIS, A. Pharmacokinetic considerations in determining the terminal elimination half-lives of bisphosphonates. **Clinical Drug Investigation**, v. 25, n. 2, p. 107-14, 2005.

LAZAROVICI, T.; YAHALOMY, R.; TAICHER, E.; ELAD, S.; HARDAN, J.; YAROM, N. Bisphosphonate- Related Osteonecrosis of the Jaws: A Single-Center Study of 101 Patients. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 67, p. 850-855, 2009.

LIBERMAN, U. A. et al. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. The Alendronate Phase III Osteoporosis Treatment Study Group. **New England Journal of Medicine**, v. 333, n. 22, p. 1437-43, 1995.

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

MAHL, C. et al. Evaluation of radiographic density and proportion of trabecular bone in the femur of female rats medicated with glucocorticoid and bisfosfonate, **Revista Odonto Ciência**, v. 24, n. 1, p. 28-31. 2009.

MARZOUK, M. et al. Osteoconductive Effects of Vinyl Styrene Microbeads in Rat Calvarial Defects. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.65, n.8, p.1505-16, 2007.

MASARACHIA, P. et al. Comparison of the distribution of 3H-alendronate and 3H-etidronate in rat and mouse bones. **Bone**, v. 19, n. 3, p. 281-90, 1996.

MENEZES, A. M. et al. Effect of sodium alendronate on alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, v. 76, n. 11, p. 1901-9, Nov 2005.

MING, N. et al. rhBMP-2 not alendronate combined with HA-TCP biomaterial and distraction osteogenesis enhance bone formation. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 131, p. 1469-1476, 2011.

MOLLER, B. et al. Prevention of the surface resorption of bone grafts by topical application of bisphosphonate on different carrier materials. **Clinical Oral Investigations**, v. 18, p. 2203-2211, 2014.

MOTTA, V.; WAGNER, M. **Bioestatística**. Caxias do Sul: EducS, São Paulo: Robe Editorial, 2003. 201 p.

NAIDU, A. et al. The Effects of Bisphosphonates on Osteoblasts in vitro. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology**, v. 106, p. 5-13, 2008.

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

PETTINICCHIO, M. et al. Histologic and histomorphometric results of three bone graft substitutes after sinus augmentation in humans. **Clinical Oral Investigations**, v. 16, n. 1, p. 45-53, 2012.

PORRAS, A. G.; HOLLAND, S. D.; GERTZ, B. I. Pharmacokinetics of alendronate. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 36, n. 5, p. 315-28, 1999.

REINHOLZ, G. G.; GETZ, B.; PEDERSON, L.; SANDERS, E. S.; SUBRAMANIAM, M.; INGLE, J. N. et al. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. **Cancer Research**, v. 1, n. 60(21):6001-7. 2000

ROCHA, S. M. W. **Análise do reparo ósseo com alendronato de sódio associado ao osso bovino liofilizado (Bio-Oss®) – Estudo Radiomicrográfico em Calvária de Coelho**. [Tese] João Pessoa (PB) Universidade Federal da Paraíba, 2013.

RUSSEL, R. G.; WATTS, N. B.; EBETINO, F. H.; ROGERS, M. J. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. **Osteoporosis International**. v. 19,n. 6, p. 733-59, 2008

RUSSELL, R. G; ROGERS, M. J. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. **Bone**, v. 25, n. 1, p. 97-106, 1999.

SANTAMARIA, J. et al. Influence of bisphosphonates on alveolar bone density: a histomorphometric analysis. **Brazilian Oral Research**, v. 24, n. 3, p. 309-315, 2010.

SATO, M. et al. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. **Journal of Clinical Investigation**, v. 88, n. 6, p. 2095-105, 1991.

SCHENK, R. et al. Quantitative morphometric evaluation of the inhibitory activity of new aminobisphosphonates on bone resorption in the rat. **Calcified Tissue International**, v. 38, n. 6, p. 342-9, 1986.

SEO, S. W. et al. Zoledronate reduces unwanted bone resorption in intercalary bone allografts. **International Orthopaedics**, v. 34, n. 4, p. 599-603, 2010.

SHARMA, A.; PRADEEP, A. R. Clinical efficacy of 1% alendronate gel in adjunct to mechanotherapy in the treatment of aggressive periodontitis: a randomized controlled clinical trial. **Journal of Periodontology**, v. 83, n.1, p. 19-26, 2012a.

SHARMA, A.; PRADEEP, A. R. Clinical Efficacy of 1% Alendronate Gel as a Local Drug Delivery System in the Treatment of Chronic Periodontitis: A Randomized, Controlled Clinical Trial. **Journal of Periodontology**, v. 83, n. 1, p.11-18, 2012b.

SHIMIZU, E. et al. Alendronate Affects Osteoblast Functions by Crosstalk through EphrinB1-EphB. **Journal of Dental Research**, v. 91, n. 3, p. 268-274, 2012.

SILVA, F. M. S.; MAZZONETTO, R. Avaliação clínica e histológica da associação de enxerto ósseo bovino e proteína óssea morfogenética em levantamento de seio maxilar. **Revista Implant news**, v. 3, n. 4, p. 377-82, 2006

SRISUBUT, S.; TEERAKAPONG, A.; VATTRAPHODES, T.; TAWEECHASUPAPONG, S. Effect of local delivery of alendronate on bone formation in bioactive glass grafting in rats. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontology**, v. 104, p. 11-16, 2007.

STUDENT, The probable error of a mean. **Biometrika**, v. 6, p. 1-25, 1908.

SUN, J. et al. Effects of alendronate on human osteoblast-like MG63 cells and matrix metalloproteinases. **Archives of Oral Biology**, v. 57, p. 728-736, 2012.

TENENBAUM, H. C. et al. Bisphosphonates and periodontics: potential applications for regulation of bone mass in the periodontium and other therapeutic/diagnostic uses. **Journal of Periodontology**, v. 73, n. 7, p. 813-22, Jul 2002.

TOKER, H. et al. Alendronate enhances osseous healing in a rat calvarial defect model. **Archives of Oral Biology**, v. 57, n. 11, p. 1545-50, 2012.

VAN BEEK, E. R.; LOWIK, C. W. G. M.; PAPAPOULOS S.E. Bisphosphonates suppress bone resorption by a direct effect on early osteoclast precursors without affecting the osteoclastogenic capacity of osteogenic cells: the role of protein geranylgeranylation in the action of nitrogen-containing bisphosphonates on osteoclast precursors. **Bone**, v. 30, n. 1, p. 64-70, 2002.

VEENA, H. R.; PRASAD, D. Evaluation of an aminobisphosphonate (alendronate) in the management of periodontal osseous defects. **Journal of Indian Society Periodontology**, n. 14, n. 1, p. 40-5, 2010.

VICENTE NETO, P. et al. Análise histomorfométrica do reparo ósseo em tíbias de ratos castrados submetidos ao efeito do alendronato de sódio. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 58, n. 4, p. 491-496, 2010.

VON KNOCH, F. et al. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. **Biomaterials**, v. 26, n. 34, p. 6941-9, 2005.

WALLACE, S. et al. Sinus augmentation utilizing anorganic bovine bone (Bio-Oss) with absorbable and nonabsorbable membranes placed over the lateral window: histomorphometric and clinical analyses. **International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, v. 25, n. 6, p. 551-9, 2005.

WHEELER, S. L. Sinus augmentation for dental implants: the use of alloplastic materials. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 55, n. 11, p. 1287-93, 1997.

WHEELER, S.L.; HOLMES, R. E.; CALHOUN, C. J. Six-Year Clinical and Histologic Study of Sinus-Lift Grafts. **International Journal of Oral Maxillofacial Implants**, v. 11, n. 1, p. 26-34, 1996.

WOZNEY, J. M. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 32, n. 2, p. 160-7, 1992.

YAFFE, A. et al. Disposition of alendronate following local delivery in a rat jaw. **Journal of Periodontology**, v. 70, n. 8, p. 893-5, 1999.

YAFFE, A. et al. Local delivery of an amino bisphosphonate prevents the resorptive phase of alveolar bone following mucoperiosteal flap surgery in rats. **Journal of Periodontology**, v. 68, n. 9, p. 884-9, 1997.

YAFFE, A. et al. The effect of bisphosphonate on alveolar bone resorption following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. **Journal of Periodontology**, v. 66, n. 11, p. 999-1003, 1995.

ZECHA, P. et al. Applicability of equine hydroxyapatite collagen (eHAC) bone blocks for lateral augmentation of the alveolar crest. A histological and histomorphometric analysis in rats. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v. 40, p. 533-542, 2011.

ANEXO A - Aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFES



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 010/2014, relativo ao projeto de pesquisa intitulado **"Uso de alendronato de sódio e da laserterapia associados ao Bio-OSS no reparo de defeitos ósseos críticos. Estudo histomorfométrico e microtomográfico em calvária de ratos."** que tem como responsável o (a) docente **Daniela Nascimento Silva**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 06/06/14.


Presidente do
Comitê de Ética no Uso de Animais
CEUA/UFES

Vitória (ES), 06 de junho de 2014.

ANEXO B - Laudo farmacêutico da manipulação do alendronato de sódio

Bauru, 29 de julho de 2014.

MANIPULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE ALENDRONATO DE SÓDIO 1,6 mg/L

Descrição da formulação:

| Substância | Concentração para cada 100 mL | Fator de equivalência | Concentração final para cada 100 mL | Lote | Fornecedor |
|---|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|----------|-------------------------------|
| Alendronato de sódio trihidratado | 0,16 mg | 1,57 | 0,2512 mg | AS/07/13 | Galena Química e farmacêutica |
| Metilparabeno (conservante) | 0,15 g | 1 | 0,15 g | 20131014 | Deg-Fagron |
| Água desmineralizada (por osmose reversa) | qsp 100 mL | 1 | | 29032014 | PharmáciaSpecifica |

- ◆ Número de Registro da formulação em nosso cadastro: 3.121.676
- ◆ Fator de equivalência: aplicado nos cálculos da formulação para corrigir o alendronato de sódio trihidratado em termos de ácido alendrônico (1,57).
- ◆ Embalagem dispensada: frasco de vidro de cor âmbar com tampa e batoque com capacidade para 10 mL.
- ◆ Descrição: líquido incolor, de cheiro característico do metilparabeno, transparente sem precipitados.
- ◆ Quantidade: 20 frascos com 5 mL.

Pharmácia Specifica Ltda. ME

Rua Gustavo Maciel 14-65 - Bauru-SP
CNPJ 52.791.548-0001/09

Farmacêutica Responsável:

Paula Renata AP. Nigro Rivera Carazzatto

CRF-9580-SP