

BLANCA EMPERATRIZ REAL LÓPEZ

**Estudo histológico e imuno-histoquímico do efeito do alendronato
sódico administrado local e sistemicamente na reparação de defeitos
preenchidos com xenoenxerto porcino no osso parietal de ratos**

São Paulo

2018

BLANCA EMPERATRIZ REAL LÓPEZ

Estudo histológico e imuno-histoquímico do efeito do alendronato sódico administrado local e sistemicamente na reparação de defeitos preenchidos com xenoenxerto porcino no osso parietal de ratos

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Biomateriais e Biologia oral), para obter o título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Víctor Elias Arana-Chavez

São Paulo
2018

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

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Real López, Blanca Emperatriz.

Estudo histológico e imuno-histoquímico do efeito do alendronato sódico administrado local e sistematicamente na reparação de defeitos preenchidos com xenoenxerto porcino no osso parietal de ratos / Blanca Emperatriz Real López; orientador Victor Elias Arana-Chavez -- São Paulo, 2018.

90 p. : fig. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Biomateriais e Biologia Oral. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Xenoenxertos. 2. Alendronato. 3. Regeneração óssea. 4. Osteopontina. 5. Microscopia. 6. Imuno-histoquímica. 7. Biomateriais. I. Arana-Chavez, Victor Elias. II. Título.

Real López BE. Estudo histológico e imuno-histoquímico do efeito do alendronato sódico administrado local e sistemicamente na reparação de defeitos preenchidos com xenoenxerto porcino no osso parietal de ratos. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:10/12/2018

Banca Examinadora

Profa. Dra.Marcia Martins Márques

Instituição: FOUSP

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira

Instituição: FOUSP

Julgamento: Aprovada

Profa. Dra. Lorraine Braga Ferreira

Instituição: La Charité - Universitätsmedizin de Berlin.

Julgamento: Aprovada

DEDICATÓRIA

A meus filhos Juli e Carlitos, minha razão de existir, de lutar, de ser a cada dia uma mãe e uma pessoa melhor, àqueles que, apesar de sua tenra idade, sempre me compreenderam e me encorajaram a seguir adiante. Vocês, meus amores, fazem que cada dia, cada esforço valha a pena.

À minha família, meus pais Manuel e Margoth, que sempre foram meu exemplo de coragem, de trabalho, de amor e dedicação à família.

A meus irmãos Rosa, Guadalupe e David pelo carinho e apoio de sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao meu orientador, Prof. Victor Elias Arana-Chavez. Obrigada pela paciência e confiança no meu trabalho, por todos seus ensinamentos, por sua predisposição e apoio, sempre, que fizeram possível a conclusão deste trabalho. Obrigada pela oportunidade de trabalhar com você, foi um grande privilégio.

Minha gratidão à Universidade Central do Equador e suas autoridades, que apostaram na formação de seus professores como um passo firme para levar a UCE a caminhar rumo à excelência acadêmica e à pesquisa, e forneceram todo o apoio para atingir esse objetivo.

Para a Universidade de São Paulo e suas autoridades, por acreditar neste projeto de apoio interinstitucional.

À Profa. Marcia Martins Marques, obrigada por este projeto, pela sua dedicação, pelo carinho para com todos nós, por acreditar que juntos podemos obter grandes coisas.

Aos coordenadores do DINTER, Prof. Rafael Yague Ballester e Prof Michel Crosato, estes, que com a Marcia, acompanharam cada etapa, vocês fizeram possível este projeto e com seu trabalho e carinho marcaram a vida da UCE e de cada um de nós.

Ao Eduardo, meu amigo e colega de estudo, obrigada pelo apoio. Nós somos uma grande equipe.

Aos meus irmãos de coração, Paulo, Jomara, Marcia, Ma. Isabel, Ruth, Alejandro e Kathy, Ine obrigada pela sua amizade, seu carinho, seu apoio. Suas palavras de encorajamento me estimularam a seguir em frente a cada dia, Vocês são uma bênção de Deus na minha vida.

Ao Professor Rafael, obrigada pelo apoio, por seu tempo e sua generosa dedicação.

À Elisângela, obrigada pela predisposição para nos apoiar e ensinar, por se tornar a amiga com quem sempre podia contar, e à Douglas pela sua generosa ajuda.

Lorraine obrigada pela amizade e por sua gentileza sempre.

Às minhas colegas do laboratório de Biologia Oral: Gabriela, Claudia, Thais, Simone, o meu obrigado.

Aos funcionários do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral, Rosa Nogueira e Elidamar Guimarães, aos funcionários da Secretaria de Pós-graduação e da Biblioteca, obrigada pelo apoio e eficiente trabalho.

Todos vocês são mais uma amostra do amor de Deus e de como ele é generoso para comigo.

“A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar.”

Eduardo Galeano

RESUMO

Real López BE. Estudo histológico e imuno-histoquímico do efeito do alendronato sódico administrado local e sistemicamente na reparação de defeitos preenchidos com xenoenxerto porcino no osso parietal de ratos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

A regeneração óssea guiada é usada na reparação de defeitos ósseos com suficiente evidência de sucesso. Dentro desta técnica, os xenoenxertos são uma boa opção devido as suas características e segurança para o paciente. Todavia, estudos para melhorar as propriedades dos substitutos ósseos para a formação adequada de novo osso são constantes. Os bisfosfonatos (BPs) são análogos sintéticos dos pirofosfatos, constituem a primeira linha de tratamento para algumas desordens ósseas e tem sido utilizado com sucesso para reduzir o risco de fratura e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Os efeitos adversos e benefícios dos BPs são amplamente estudados. Está comprovado que os BPs inibem a reabsorção óssea reduzindo a atividade dos osteoclastos, mas também que as células osteoblásticas na presença de BPs que contêm nitrogênio aumentam sua proliferação e sua diferenciação na linhagem osteoblástica, promovendo mineralização além de inibir a apoptose de osteócitos e osteoblastos. Neste trabalho estudou-se o efeito do alendronato administrado local e sistemicamente na regeneração óssea com xenoenxerto porcino em ratos com defeitos críticos no osso parietal. Foram usados sessenta ratos Wistar albinos, distribuídos em três grupos (n=20), sendo que o grupo controle (GC) teve o defeito tratado apenas com xenoenxerto, o grupo experimental XE-ALNL que recebeu o xenoenxerto previamente hidratado com alendronato sódico, e o terceiro grupo, XE-ALNS, recebeu xenoenxerto com administração sistêmica diária de alendronato. As amostras foram fixadas, descalcificadas e processadas para análise histológica em microscopia de luz, histoquímica para fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP), e imuno-histoquímica para osteopontina (OPN). Determinou-se que o uso de alendronato potencializa a formação de novo osso. O que pode ser explicado pelo efeito conservador do alendronato no xenoenxerto prolongando seu efeito osteocondutor. Os resultados do grupo XE-ALNL mostraram que o efeito do alendronato sódico usado na hidratação do xenoenxerto colocado no defeito provocou uma maior formação de novo osso primário, tanto ao redor das bordas que limitavam

o defeito como dos grânulos de xenoenxerto, quando comparado ao GC e ao grupo XE-ALNS, para os dois períodos avaliados (30 e 60 dias). Ainda que no grupo XE-ALNS nas amostras avaliadas para o período de 30 dias seu padrão foi similar ao GC, no período de 60 dias se observou maior quantidade de osso novo em relação ao GC no mesmo período. A presença de tecido conjuntivo com suas fibras colágenas entre os grânulos do xenoenxerto foi confirmada com a coloração de tricrômico de Mallory. A imunomarcagem de OPN mostrou as áreas de osso primário formadas, bem como a presença de algumas linhas cimentantes. A escassa presença de osteoclastos evidenciou a baixa taxa de reabsorção dos grânulos do xenoenxerto nos períodos avaliados.

Palavras-chave: Xenoenxerto porcino. Alendronato sódico. Regeneração óssea. Osteopontina. Microscopia. Imuno-histoquímica. Biomateriais.

ABSTRACT

Real López BE. Histological and immunohistochemical study of the effect of sodium alendronate dispensed locally and systemically in the repair of defects filled with porcine xenograft in rat parietal bone [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

Guided bone regeneration is used in treatment for repairing bone defects with proven evidence of success. Within this technique, xenografts are a good alternative because of its characteristics and safety for the patient; however, studies aiming to enhance the properties of bone substitutes for proper formation of new bone is continuous. Bisphosphonates (BPs) are synthetic analogues of pyrophosphates, they represent the first line of treatment for some bone disorders. They have been successfully used to reduce the risk of fracture and improve the quality of life for patients, its adverse effects and benefits are widely studied. It has been established that BPs inhibit bone resorption by reducing osteoclast activity but also that osteoblastic cells in the presence of nitrogen-containing BPs increase their proliferation and differentiation in the osteoblastic lineage, inducing mineralization, and inhibiting apoptosis of osteocytes and osteoblasts. This study investigated the effect of alendronate administered locally and systemically on bone regeneration with porcine xenograft in rats with critical defects (5 mm in diameter) made in the parietal bone. Sixty Wistar albino rats were divided into three groups (n=20): control group (CG) with defect treated only with xenograft, XE-ALNL group received xenograft previously hydrated in 1 mg/ml of alendronate sodium, and the third group, XE-ALNS, received xenograft with daily systemic administration of alendronate (2.5 mg / kg). Each experimental group was randomly divided into two sub-groups (n=10): in the first sub-group of each experimental group the animals were sacrificed after 30 days and in the second after 60 days. The samples were fixed, decalcified and processed for light microscopic analysis, histochemistry for tartrate-resistance acid phosphatase (TRAP), and immunohistochemistry for osteopontin (OPN). The results of the XE-ALNL group showed that the effect of sodium alendronate used in the hydration of the xenograft placed in the defect caused a superior formation of new primary bone, both around the edges that limited the defect and the xenograft granules, when compared to CG and the XE-ALNS groups, for both periods of 30 and 60 days. For the XE-ALNS group even though smaller amount of primary bone was formed when compared to XE-ALNL at

30 and 60 days, its pattern was similar to the CG at 30 days; however, for the 60 days sub-group a greater amount of new bone was observed when compared to the CG in the same period. The presence of connective tissue with its collagen fibers between the granules of the xenograft was confirmed with Mallory's trichrome staining. The OPN immunolabeling showed the areas of primary bone formed, as well as the presence of cement lines. The low osteoclast presence indicated a low rate of xenografts reabsorption in the evaluated periods.

Key-words: Porcine xenograft. Sodium alendronate. Bone regeneration, Osteopontin. Microscopy. Immunohistochemistry. Biomaterials

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Defeito ósseo crítico unilateral em osso parietal.47
- Figura 4.2 – Defeito ósseo tratado com xenoenxerto porcino48
- Figura 4.3 - Membrana de colágeno cobrindo o enxerto48
- Figura 4.4 - Redução do tamanho dos espécimes previa imersão em parafina50
- Figura 5.1 - GRUPO CONTROL 30 DIAS: Em A, observa-se as bordas de osso (BO) do defeito com formação de osso primário (seta). Os grânulos de xenoenxerto (XE) apresentam-se com um tamanho heterogêneo, entre 600 μm e 1000 μm , observando-se entre eles abundante tecido conjuntivo (TC). Na borda superior note-se a presença da membrana de colágeno (M) perfeitamente localizada e limitando a área do defeito. Em B, aparecem em maior aumento os grânulos de enxerto e o tecido conjuntivo (TC) circundante, com alguns osteoblastos (Ob) em contato com os grânulos. Em C, observa-se tecido ósseo primário depositado sobre as bordas do defeito (seta). Em D, osteoclastos (Oc) TRAP-positivos adjacentes aos grânulos de enxerto. Em E, tecido conjuntivo entre os grânulos do enxerto com fibras colágenas (Fc) evidenciadas em azul pelo tricrômico de Mallory. A, 40x; B, 200x; C, 100x; D, 400x; E400x.54
- Figura 5.2 - GRUPO TRATADO COM XE-ALNL 30 DIAS: Em A, observa-se as bordas de osso (BO) do defeito com formação de osso primário (OP) (seta). Observa-se também importante formação de osso primário na borda inferior adjacente à dura-máter. Os grânulos de xenoenxerto (XE) apresentam-se com um tamanho heterogêneo, entre 600 μm e 1000 μm . Na borda superior localiza-se a membrana de colágeno (M). Em B, os grânulos de enxerto aparecem com fina camada de osso primário (OP) com presença de osteócitos (Ot), enquanto tecido conjuntivo (TC) preenche as outras regiões. Em C, observa-se tecido ósseo primário depositado sobre as bordas do defeito (seta). Em D, osteoclastos (Oc) TRAP-positivos aderidos aos grânulos de enxerto. Em E, aparecem intensamente coradas em azul pelo tricrômico de Mallory tanto a matriz (Fc) do osso primário na superfície do xenoenxerto como áreas de osso primário da superfície interna do defeito. As fibras colágenas do tecido conjuntivo observam-se levemente coradas. A, 40x; B, 200x; C, 100x; D, 400x; E200x.56
- Figura 5.3 - GRUPO TRATADO COM XE-ALNS 30 DIAS: Em A, observa-se as bordas de osso (BO) do defeito com formação discreta de osso primário (seta).

Os grânulos de xenoenxerto (XE) apresentam-se com um tamanho heterogêneo, entre 600 µm e 1000 µm, com abundante tecido conjuntivo (TC) entre eles. Na borda superior note-se a presença da membrana de colágeno (M) limitando a área do defeito. Em B, é observado o osso primário depositado nas bordas do defeito (seta). Em C, alguns osteoblastos são observados em contato os grânulos de enxerto, bem como o tecido conjuntivo (TC) entre eles. Em D, imagem que mostra osteoclastos (Oc) TRAP-positivos aderidos aos grânulos de enxerto. Em E, fibras colágenas do tecido conjuntivo localizado entre os grânulos de enxerto aparecem coradas pelo tricrômico de Mallory. A, 40x; B, 100x; C, 400x; D, 400x; E400x. 58

Figura 5.4 - GRUPO CONTROL 60 DIAS: Em A, observa-se a formação de osso primário (OP) nas bordas de osso (BO) do defeito (seta). Os grânulos de xenoenxerto (XE) apresentam-se com um tamanho heterogêneo, entre 600 µm e 1000 µm de diâmetro, com a presença de tecido conjuntivo (TC) entre eles. Em B, observa-se uma das bordas com tecido ósseo primário sobre a superfície (seta). Em C, com maior aumento se aprecia os grânulos de enxerto rodeados de osso primário com presença de osteócitos (Ot) e tecido conjuntivo (TC). Em D, observa-se osteoclastos (Oc) TRAP-positivos aderidos à borda do enxerto. Em E, fibras colágenas (Fc) tanto do tecido conjuntivo como do osso primário são evidenciadas pelo tricrômico de Mallory. A, 40x; B, 200x; C, 100x; D, 400x; E200x.. 60

Figura 5.5 - GRUPO TRATADO COM XE-ALNL 60 DIAS: Em A, observa-se as bordas de osso (BO) do defeito com formação de osso primário (OP) ao redor (seta) assim como também na borda inferior adjacente a dura-máter importante formação de osso primário, com aspecto trabeculado. Entre os grânulos de xenoenxerto (XE) há presença de tecido conjuntivo (TC), na borda superior localiza-se a membrana de colágeno (M). Em B, observa-se os grânulos de enxerto rodeados de osso primário com presença de osteócitos (Ot), bem como por tecido conjuntivo (TC). Em C, a maior aumento observa-se tecido ósseo primário formado ao redor das bordas do defeito (seta). Em D, imagem que mostra osteoclastos (Oc) TRAP-positivos aderidos a grânulos de xenoenxerto. Em E, matriz colagenosa (Fc) do osso presente ao redor de pequenos grânulos de xenoenxerto. A, 40x; B, 200x; C, 100x; D, 400x; E200x..... 62

Figura 5.6 - GRUPO TRATADO COM XE-ALNS 60 DIAS: Em A, observa-se as bordas de osso (BO) do defeito com formação de osso primário (seta). Os grânulos de xenoenxerto (XE) apresentam-se com um tamanho heterogêneo entre 600 µm e 1000 µm de diâmetro, com presença de tecido conjuntivo (TC) entre eles, e em alguns, tecido ósseo primário ao redor. Na borda superior note-se a presença da membrana de colágeno (M) limitando a área de enxerto. Em B, observa-se a formação de osso primário a partir da borda do defeito (seta). Em C, com maior aumento se aprecia os grânulos de enxerto rodeados de osso primário (OP) e tecido conjuntivo (TC) entre eles. Em D, imagem que mostra dois grânulos de

enxerto com osteoclastos TRAP-positivos, alguns aderidos (Oc), e outros latentes (Ocl). Em E, tricômico de Mallory mostrando a presença entre os grânulos de tecido conjuntivo com fibras colágenas. A, 40x; B, 100x; C, 100x; D, 400x; E200x.....64

Figura 5.7 - Imuno-histoquímica para Osteopontina (OPN): grupos de estudo a 30 dias GC: em A, B; grupo XE-ALNL C, D; grupo XE-ALNS E, F. Observe-se nas marcações (seta) presença da proteína ao redor das bordas e dos grânulos de xenoenxerto (XE). Em C e D note-se marcação da proteína em osso primário formado ao redor dos grânulos de xenoenxerto. Aumento: A, 200x; B, 400x; C, 100x; D, 200x; E100x: F400x.....66

Figura 5.8 - Imuno-histoquímica para Osteopontina (OPN): grupos de estudo a 60 dias: grupo GC em A, B; grupo XE-ALNL C, D; grupo XE-ALNS E, F. Observe-se nas marcações (seta) presença da proteína OPN no osso primário formado ao redor das bordas e dos grânulos de xenoenxerto (XE) evidenciando uma maior integração do xenoenxerto. Nas bordas em A, C e E pode-se observar formação de linhas cimentantes. Aumento 100x67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALN	Alendronato de sódio
XE-ALNL	Xenoenxerto tratado com Alendronato de sódio local
XE-ALNS	Xenoenxerto tratado com Alendronato de sódio sistêmico
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CEUA	Comité de Ética no Uso de Animais
DAB	Sigla em inglês para 3.3' <i>diaminobenzidine</i>
et al.	e outros
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
Fc	Fibra colágena
GC	Grupo controle
M	Membrana
OPN	Osteopontina
OP	Osso Primário
RPM	Revoluções por minuto
Ob	Osteoblastos
Oc	Osteoclastos
OI	Osteoclasto latente
Ot	Osteócitos
PBS	Sigla em inglês para <i>phosphate buffered saline</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
TC	Tecido Conjuntivo
TRAP	Sigla em inglês para Fosfatase ácida resistente ao tartarato
XE	Xenoenxerto
°C	Graus Celsius
n	Número
BO	Borda óssea
OPG	Osteoprotegerina
RANKL	Sigla em inglês para <i>receptors activator of nuclear fator KB ligand</i>
RANK	Sigla em inglês para <i>receptors activator of nuclear fator KB</i>

TGFβ	Siglas em inglês para <i>Transforming growth fator beta</i>
IGF-1	Siglas em inglês para <i>Insulin-like growth fator 1</i>
Cx 43	Conexina 43
IL-6	Interleucina 6
PTH	Paratormônio
EDTA	Siglas em inglês para <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
M-CFS	Siglas em inglês para <i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
BMPs	Siglas em inglês para Proteínas morfogenéticas ósseas

LISTA DE SÍMBOLOS

g	grama
ml	mililitro
Kg	quilograma
mm	milímetros
μm	micrômetro
M	molar
mg	miligrama
μl	microlitro
%	Sinal matemático de porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
2	REVISÃO DA LITERATURA	28
2.1	TECIDO ÓSSEO	28
2.1.1	ESTRUTURA E COMPONENTES DO TECIDO ÓSSEO.....	28
2.1.1.1	MATRIZ ORGÂNICA	28
2.1.1.1.1	COMPONENTES NÃO COLÁGENOS	29
2.1.1.2	CÉLULAS DO TECIDO ÓSSEO.....	29
2.1.1.2.1	OSTEOBLASTOS	30
2.1.1.2.2	OSTEÓCITOS.....	31
2.1.1.2.3	OSTEOCLASTOS	32
2.1.2	REMODELAÇÃO ÓSSEA	33
2.1.2.1	REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA.....	34
2.2	ENXERTOS ÓSSEOS E SUBSTITUTOS ÓsSEOS.....	34
2.2.1	AUTOENXERTOS.....	36
2.2.2	ALOENXERTOS.....	36
2.2.3	ALOPLÁSTICOS	37
2.2.4	XENOENXERTOS.....	37
2.3	BISFOSFONATOS.....	39
3	PROPOSIÇÃO	43
3.1	PROPOSIÇÃO GERAL	43
3.2	PROPOSIÇÕES ESPECÍFICAS:	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	46
4.2	ALENDRONATO SÓDICO SISTÊMICO	49
4.3	OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES E FIXAÇÃO.....	49
4.4	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	50
4.5	HISTOQUÍMICA PARA TRAP	51
4.6	DETECÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE OSTEOPONTINA	51
5	RESULTADOS	53
5.1	ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOQUÍMICA(TRAP)	53
5.1.1	Período de 30 dias	53

5.1.2	Período 60 dias.....	59
5.2	ANÁLISE OSTEOPONTINA	65
6	DISCUSSÃO.....	69
7	CONCLUSÕES.....	74
	REFERÊNCIAS	76
	ANEXO – Parecer da Comissão de Ética no uso de animais	91

1 INTRODUÇÃO

Os enxertos ósseos têm sido amplamente utilizados na atualidade para melhorar a regeneração óssea em um grande número de situações clínicas resultantes de traumas, remoção de tumores e outros variados tipos de procedimentos cirúrgicos.

Existem três propriedades principais que um material ideal para enxerto deve desencadear: osteogênese, osteocondução e angiogênese. A primeira diz respeito à atividade das células formadoras de osso; a segunda, à capacidade de se constituir num arcabouço para as células formadoras e a terceira, à capacidade de garantir a nutrição mediante uma boa irrigação sanguínea.

Existe uma variedade de possibilidades de biomateriais para enxerto, cada uma com suas vantagens e inconvenientes. O mais eficiente regenerador seria o autoenxerto, mas apresenta os inconvenientes de ser escasso e ser obtido mediante um trauma provocado ao paciente. Os aloenxertos também são de difícil obtenção e, assim, o desenvolvimento e melhora tanto dos xenoenxertos como dos enxertos aloplásticos constituem uma opção para resolver as necessidades de regeneração óssea dos diferentes defeitos. Porém, a necessidade de melhorar o volume obtido e a qualidade de osso formado fez com que os estudos se encaminhassem para a utilização de técnicas e combinações de drogas que promovem a manutenção ou estímulos do osso; entre essas drogas estão os bisfosfonatos (BPs).

Os BPs interferem na atividade clástica e, portanto, diminuem a reabsorção dos tecidos mineralizados, melhorando ou alterando a reparação e remodelação óssea. Essas drogas vêm sendo amplamente utilizadas com sucesso para reduzir o risco de fratura e melhorar a qualidade de vida dos pacientes com desordens ósseas como osteoporose, doença de Paget, displasia fibrosa, câncer de osso, e inflamações relacionadas com perda óssea. Além disso, os BPs podem também estimular a atividade dos osteoblastos, sendo estabelecida a relação entre osteoblastos e osteoclastos na biologia óssea.

Apesar de ser muito estudado, ainda há muitos aspectos desconhecidos sobre o papel dos BPs na fisiologia óssea: estudos determinam que estes têm

afinidade pelo mineral ósseo, que também induzem os osteoblastos a secretar inibidores da reabsorção e que também estimulam a formação de precursores de osteoblastos e nódulos mineralizados, promovendo a osteoblastogênese.

O alendronato é considerado o BPs mais amplamente prescrito, com evidência de efetividade nos processos de reabsorção óssea. Tem sido amplamente utilizado em estudos de modelos animais, geralmente com administração sistêmica do fármaco para avaliação de defeitos críticos. Por outro lado, o uso do alendronato com aplicação local é escassa, existindo resultados um tanto contraditórios.

Sendo assim o uso dos BPs como complemento em tratamentos de regeneração óssea onde se procura obter um volume ósseo adequado e de qualidade é possível. Existindo evidência que os xenoenxertos porcinos modificados com BPs favorecem a formação e incremento de tecido ósseo, é preciso estudar também qual é a via de administração mais efetiva desse BPs.

Assim, o presente estudo propõe analisar o efeito do alendronato administrado local ou sistemicamente sobre a regeneração óssea em defeitos criados no osso parietal de ratos preenchidos com xenoenxerto porcino.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um dos tecidos de natureza conjuntiva de consistência dura que formam o esqueleto isto devido aos cristais de hidroxiapatita que é o componente mineral na sua matriz (1, 2). Os ossos são também reservatórios de cálcio, fosfato e outros íons, sendo importantes na manutenção dos níveis no sangue (3).

Apesar da sua aparência inativa, existem regiões de osso que são reabsorvidas e outras neoformadas durante a vida toda, fenômeno conhecido como remodelação óssea, isto como resposta a estímulos sistêmicos e locais (1).

2.1.1 ESTRUTURA E COMPONENTES DO TECIDO ÓSSEO

Este tecido está macroscopicamente disposto nos ossos como osso compacto, ou cortical óssea, localizado na superfície ou como osso esponjoso, que constitui o trabeculado interno com cavidades preenchidas pela medula óssea, sua circulação é responsável pela nutrição das células ósseas (1).

O tecido ósseo é caracterizado pela fase mineral que representa 65% de seu peso constituída de fosfato de cálcio (cristais de hidroxiapatita) associados a matriz previamente formada. Os restantes 35% são constituídos por 20% de material orgânico (matriz orgânica mas células) e 15% de água (3).

2.1.1.1 MATRIZ ORGÂNICA

A matriz orgânica tem um grande papel molecular e estrutural como armação para a deposição do componente inorgânico (3).

Quando a mineralização inicia os osteoblastos secretam uma matriz constituída por 90% de colágeno, dos quais o colágeno de tipo I representa 85% e os restantes

são colágenos tipo III e V. Os 10% constitui componentes não colágenos, a maioria se associa às fibrilas colágenas outorgando à matriz as características que fazem que mineralize e mantenha o mineral confinado à matriz óssea (1, 2).

2.1.1.1.1 COMPONENTES NÃO COLÁGENOS

A maioria se associa às fibras colágenas, outorgando à matriz as características que permitem que mineralize e mantenha o mineral confinado à matriz. Os componentes mais importantes são: glicoproteínas e fosfoproteínas, como a osteopontina e a sialoproteína óssea, ambas altamente fosforiladas, consequentemente com afinidade pela hidroxiapatita, além de possuir a sequência RGD que se liga à integrinas da membrana plasmática das células. Se ligam também ao colágeno e às outras proteínas da matriz. Esta propriedade de adesão explica a presença destas proteínas nas linhas cimentantes. A deposição continuada de estas proteínas não colágenas durante a fase ativa da formação óssea contribui para a regulação da mineralização e conferir coesão entre a matriz mineralizada (4).

Outras proteínas não colágenas são: osteonectina, uma proteína acídica, rica em cisteína, e osteocalcina, rica no aminoácido glutamina (1, 5).

Os proteoglicanos de cadeias pequenas ricos em leucina como decorin, biglican, lumican e osteoaderin estão presentes na matriz mineralizada, além das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e algumas proteínas séricas (1)

2.1.1.2 CÉLULAS DO TECIDO ÓSSEO

O primeiro grupo das células do tecido ósseo se originam de células indiferenciadas de origem ectomesenquimal (na região craniofacial) que são induzidas a se diferenciarem em osteoblastos. Alguns destes são rodeados pela matriz óssea, ficando conectados por canalículos tornando-se osteócitos. Quando os osteoblastos da superfície param de secretar matriz recobrem a última camada desta formando o

osteóide. O segundo grupo de células são as relacionadas com a reabsorção óssea que provém da fusão de células da linhagem monocítica do sangue que no osso são os osteoclastos que se apresentam como células gigantes multinucleadas (1).

2.1.1.2.1 OSTEÓBLASTOS

Derivam das células mesenquimais indiferenciadas respondendo a um complexo sistema de sinalização (3, 6). São responsáveis pela síntese e secreção da matriz orgânica do osso, pela formação das vesículas da matriz, estão associados à fosfatase alcalina e envolvidos na gênese do tecido ósseo e sua mineralização (3, 5, 7).

No seu citoplasma, desenvolvem-se organelas de síntese e secreção proteica tales como: complexo de Golgi, retículo endoplasmático rugoso e grânulos de secreção que se polarizam para o lado da célula onde a matriz está sendo depositada. Assim estas células formam uma camada contínua em torno da matriz (1).

Nos primeiros estágios da formação do osso, junções intercelulares oclusivas do tipo focal começam a ser formadas entre os osteoblastos recém diferenciados, compartimentalizando parcialmente a matriz óssea jovem e influenciando possivelmente a morfogênese do tecido ósseo primário, antes dos eventos de remodelação (3, 6).

Quando os osteoblastos não estão formando matriz, são denominadas células de revestimento ósseo, que revestem a matriz calcificada, podendo voltar à síntese e à secreção de matriz se houver a necessidade de formação de novo osso. As células de revestimento ósseo participam da regulação da atividade osteoclástica, liberando os fatores osteoprotegerina (OPG) ou o RANKL, dependendo da necessidade fisiológica do osso (1, 2, 6).

Além disso, os osteoblastos funcionam como receptores e transmissores de sinais para remodelação. Tem receptores para hormônios como da paratireoide e da tireoide, estrógenos, vitamina D, glicocorticoides, insulina. Vários fatores locais como prostaglandinas, citocinas e interleucinas também agem em relação à proliferação, diferenciação e atividade dos osteoblastos. Assim secretam numerosos fatores

reguladores, tais como interleucinas (IL-6) e fatores de crescimento, como TGF- β e IGF-1 (3, 6).

2.1.1.2.2 OSTEÓCITOS

Os osteócitos, as células mais numerosas do tecido ósseo, são osteoblastos que ficaram envolvidos na matriz óssea mineralizada, cessando sua atividade secretora (1, 8). São células elipsoides que no seu citoplasma tem um núcleo esférico rodeado de poucas cisternas de retículo endoplasmático rugoso e sáculos de complexo de Golgi, característica que reflete a pouca atividade metabólica, mas sua vitalidade é indispensável para a manutenção da homeostase óssea (3). Do corpo celular se originam numerosos e finos prolongamentos que contatam os prolongamentos dos osteócitos vizinhos, estabelecendo junções comunicantes que contem principalmente conexina 43 (Cx43). Assim, na matriz óssea mineralizada forma-se o sistema lacuno-canalicular, pelo qual chegam os nutrientes e sinais a todos os osteócitos, que são também capazes de produzir sinais para remodelação em resposta a fatores mecânicos (1-3, 7).

As pressões e trações que ocorrem nos ossos pelas atividades fisiológicas ou exercícios físicos, movimentam o tráfego do fluido ósseo pelos canalículos, estimulando a expressão de esclerostina nos osteócitos, que atua como antagonista do receptor 5 para lipoproteína (LRP5) que por sua vez é um estimulador da manutenção da massa óssea. Além disso, a esclerostina inibe a via Wnt/ β -catenina, inibindo a diferenciação e/ou a ativação osteoblástica. Assim, a redução na difusão do fluido ósseo pelos canalículos desencadeia alterações nos osteócitos, que entram em apoptose, liberando ativador do fator kB ligante (RANKL), um estimulador da atividade osteoclástica. (1, 8).

2.1.1.2.3 OSTEOCLASTOS

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas contendo entre 3 e 50 núcleos. Originam-se pela fusão de células da linhagem monócito-fagocítica dos tecidos hematopoiéticos e são responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo em condições fisiológicas e patológicas (1, 3, 6).

Na região ativa do osteoclasto em contato com a matriz óssea, duas partes podem ser diferenciadas: a parte central, denominada borda em escova ou pregueada cuja membrana é de natureza lisossomal, e a que está em torno dela, a zona clara que também está em contato com a matriz óssea. A superfície que está sendo reabsorvida recebe o nome de lacuna de Howship. Na membrana plasmática da zona clara encontram-se integrinas $\alpha\beta 3$, que se ligam à sequência RGD de proteínas da matriz óssea como a osteopontina e a sialoproteína óssea (3, 7).

Seu recrutamento depende de interações entre osteoblastos/células de revestimento ósseo, células do estroma da medula óssea e as próprias células hematopoiéticas, as quais liberam fatores como a interleucina-3 (IL-3) e o fator estimulante de colônias da linhagem monocítica (M-CFS), para os quais os precursores dos osteoclastos respondem, proliferando-se e fundindo-se, originando células multinucleadas. Além disso, os precursores possuem na sua membrana plasmática, um receptor denominado receptor ativador de NF-kB (RANK), o qual é ativado por uma molécula ligante, chamada, portanto, de RANKL (1, 6).

As células multinucleadas são também ativadas pela interação RANKL-RANK. A expressão e a secreção do RANKL pelos osteoblastos/células de revestimento ósseo e por células indiferenciadas são reguladas pela vitamina D, pelo paratormônio (PTH), por prostaglandinas e pelo M-CSF. As mesmas células secretam uma proteína solúvel, a OPG, que se liga ao RANKL, imobilizando-o, regulando negativamente a ativação dos osteoclastos e seus precursores. Células do sistema imune como linfócitos T, também secretam RANKL e OPG (1, 2, 9).

A sequência dos eventos da reabsorção óssea pelos osteoclastos são ativados quando entram em contato com a superfície óssea, entre outros por intermédio de receptores de membrana (integrinas), incluindo receptores para vitronectina (3). Em seguida desenvolve-se a zona clara que fixa transitoriamente o osteoclasto na região a ser reabsorvida, e produz prótons (H^+) ficando a região com um pH entre 4 e 5. É

secretada também cistina-proteinase do tipo catepsina-K, e um dos marcadores característicos dos osteoclastos a enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) (3, 9).

A função principal do osteoclasto é a degradação da matriz óssea, mas também se sugere que estaria envolvido na fagocitose e na destruição de células ósseas principalmente osteócitos (10). Fatores elétricos, gravitacionais e biomecânicos influenciam as atividades do tecido ósseo. A regulação local da reabsorção óssea está baseada no sistema RANK/RANKL/OPG (3).

2.1.2 REMODELAÇÃO ÓSSEA

Quando as trabéculas aumentam sua espessura, aumenta também a distância entre os osteócitos da região central da trabécula e a superfície, onde está a vascularização e a fonte de nutrientes. Surge assim a necessidade de mudança estrutural no osso. Na sequência, os primeiros osteoclastos aparecem; os osteoblastos de uma determinada área cessam a deposição da matriz, degradam o osteóide e se afastam da superfície óssea, sofrendo apoptose (3, 9).

Os osteoclastos se aderem à matriz mineralizada e iniciam o processo de reabsorção; quando terminam, afastam-se e sofrem apoptose também. Células indiferenciadas são atraídas para a região, diferenciando-se em novos osteoblastos, os quais depositam proteínas não colágenas, osteopontina e sialoproteína óssea que, pelas suas propriedades adesivas, forma uma linha cimentante entre ambas matrizes. Esta linha, por ser originada entre uma superfície reabsorvida e uma nova matriz, conhecida como linha de reversão. Outro tipo de linha cimentante é a chamada “aposicional”, formada quando os osteoblastos sofrem períodos de repouso e retomam depois a deposição da matriz. A diferença entre estas linhas é que a aposicional é lisa e regular (1, 9).

O osso primário ou imaturo é pouco organizado e irregular. Tem maior densidade de osteócitos que o osso secundário, dispostos irregularmente e alojados em lacunas arredondadas. As fibras colágenas da sua matriz estão sem organização definida, dispostas menos densamente e deixam espaços interfibrilares que são ocupados pelas proteínas não colágenas, principalmente osteopontina e sialoproteína

óssea (1, 3). Gradualmente torna-se osso secundário ou maduro que tem menor densidade de osteócitos, dispostos mais regularmente e alojados em lacunas achatadas. Na matriz do osso secundário as fibras colágenas organizam-se adotando uma disposição concêntrica (3).

2.1.2.1 REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA

A regeneração de defeitos ósseos ainda constitui um desafio clínico na atualidade (11). A regeneração óssea guiada é a técnica mais versátil e efetiva para aumento da crista alveolar (12) e o procedimento mais usado e estudado para tratar defeitos ósseos, com evidência de sucesso na regeneração do osso perdido (13). Este procedimento pode permitir o aumento do osso alveolar em aproximadamente 8.5 mm nos defeitos críticos (14). A técnica requer o uso de enxertos ósseos associados com membranas (15).

O conceito de regeneração óssea guiada diz respeito a uma área fechada em torno do defeito, com uma barreira que preserve o sangue e permita a manutenção e estabilidade do espaço para infiltração e proliferação de células osteogênicas, proliferação de vasos ou angiogênese e fechamento primário da ferida (16, 17). Os enxertos ósseos funcionam principalmente como arcabouço que contribui para a proliferação celular neste processo (17, 18). O propósito é obter tecidos estrutural e funcionalmente semelhantes aos perdidos, também no que se refere à quantidade e qualidade óssea (11).

2.2 ENXERTOS ÓSSEOS E SUBSTITUTOS ÓSSEOS

O processo de reparação óssea ocorre de maneira natural. Mas nos casos de defeitos com perda óssea crítica, fratura óssea grave ou nos casos em que não se prevê a regeneração, é necessária a utilização de substitutos ósseos ou enxertos (19).

Os enxertos ósseos constituem um recurso amplamente usado para a regeneração óssea. Os enxertos ósseos são, depois da transfusão do sangue, os transplantes mais frequentes feitos no mundo (20, 21). As perdas deste tecido são

comuns como resultado de traumas, remoção de tumores e procedimentos cirúrgicos (22, 23). Assim, na prática clínica, os substitutos ósseos são usados para fins de reconstrução, reparo e aumento do estoque ósseo (24).

A incorporação dos enxertos é um processo dinâmico em que simultaneamente ocorrem reabsorção de osso necrótico e neoformação óssea. A integração dos enxertos é um processo de interdigitação e englobamento do osso do doador pelo novo tecido que forma o receptor. É muito semelhante à reparação ou consolidação das fraturas (11, 25). A resposta biológica do tecido receptor está relacionada com o origem do biomaterial (11). Começa com a destruição da estrutura vascular no local da lesão, o que forma um hematoma, reduz o suprimento de nutrientes e determina um processo inicial de reabsorção óssea. O hematoma gerado ativa moléculas de sinalização e fatores de crescimento que estimulam a proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras (11).

Os materiais de enxerto ideais devem apresentar as características que permitem a neoformação de osso alveolar, baseados em três mecanismos biológicos: osteogênese, osteoindução e osteocondução (21). A primeira consiste na capacidade de estimular a cicatrização óssea pela presença de células (25), o que exige o transporte de células ósseas vivas junto com o material de enxerto, aspecto característico inerente dos enxertos autógenos (25).

A osteoindução é a capacidade que alguns materiais tem para induzir a diferenciação de células mesenquimais pluripotentes em células osteoprogenitoras, o que é devido à presença de proteínas existentes na matriz orgânica óssea (26).

A característica dos enxertos para servir de arcação na formação de osso é a osteocondução. Significa que o material tem a capacidade de conduzir ou direcionar a neoformação sobre e entre o próprio material de preenchimento (25), o que é favorecido pela penetração de capilares sanguíneos através do enxerto (18, 26, 27). É uma característica comum em todos os substitutos ósseos, e não precisa fornecer uma interação bioquímica entre o enxerto e a área de recepção (11).

Existe ainda uma quarta característica que devem apresentar os enxertos: bioatividade, definida como a interação ou influência entre o biomaterial e o tecido circundante, característica especialmente presente nos enxertos de fosfato de cálcio (25), e que conduz a formar uma ligação na interface com o tecido adjacente (11). Um substituto ósseo ideal deve ser biocompatível, sem características antigênicas, teratogênicas ou carcinogênicas. Deve ser de fácil manipulação, estéril ou

esterilizável, hidrofílico, e apresentar propriedades mecânicas e químicas adequadas (11, 28).

Os substitutos ósseos usados em cirurgia oral ou maxilo-facial podem ser classificados, com base em sua origem biológica e fonte, como: autoenxertos, aloenxertos, xenoenxertos e enxertos aloplásticos (11).

2.2.1 AUTOENXERTOS

Este enxerto autólogo implica a retirada de osso do paciente, intraoral ou extraoral, de uma região não lesionada para seu transplante na zona de lesão. Entre todos os enxertos disponíveis, o osso autólogo é considerado como *gold standard* por suas características de osteocondução, osteoindução e osteogênicas (14, 19, 21, 25, 29, 30). Evita também problemas imunológicos (31), mas implica numa cirurgia adicional, num segundo local em que se provoca uma lesão. Há limitações a seu uso devido também à baixa disponibilidade de osso autógeno, especialmente se for retirado por via intraoral, bem como ao dano causado à área doadora, e à reabsorção imprevisível do enxerto (32, 33). Além destes inconvenientes, pode aparecer infecção óssea, já que o osso obtido, mesmo com uma profilaxia com antibióticos, pode permitir crescimento de bactérias (21). Esses inconvenientes fizeram com que os substitutos de osso se tornassem uma opção viável para os procedimentos de aumento ósseo (13), evitando-se outra intervenção e encurtando-se o período de cicatrização (18).

2.2.2 ALOENXERTOS

Estes enxertos são aqueles transferidos entre membros geneticamente diferentes da mesma espécie. Podem ser disponíveis nas formas esponjosa, cortical ou como matriz óssea desmineralizada. São primariamente osteocondutores. Embora não tenham propriedades osteogênicas, abordam várias das desvantagens da autogênese. Podem estar disponíveis em grandes quantidades e não estão

associados à morbidade do sítio doador ou ao tempo envolvido na colheita de osso autógeno(34). Porém, podem ter risco de antigenicidade, além de existir a possibilidade de transmissão de vírus e outros agentes infecciosos (11, 21, 32, 34).

2.2.3 ALOPLÁSTICOS

São substitutos ósseos sintéticos ou inorgânicos capazes de imitar as características típicas do tecido ósseo, como biodegradabilidade, bioatividade e osteocondutividade (12, 13, 24). Apesar dessas propriedades desejáveis, são conhecidos por terem propriedades mecânicas relativamente baixas (24). Constituem um grupo heterogêneo de biomateriais, quimicamente à base de cálcio, tais como fosfatos de cálcio, sulfato de cálcio, vidros bioativos e polímeros (11, 13, 18).

No entanto, apesar das vantagens em termos de disponibilidade ilimitada, ausência de resposta imune ou transferência de patógenos, estes enxertos não provocam osteoindução apropriada nem apresentam propriedades osteogênicas (33), como é o caso do fosfato tricálcio, que exhibe reabsorção rápida e pode vir a impedir o crescimento ósseo (13, 33). No mínimo, o material de enxerto deve ter propriedades osteocondutivas que guiem a neoformação e aposição óssea, permitam adesão, migração e proliferação celular (21, 31). Sua composição química, geometria, ultraestrutura e propriedades mecânicas são os determinantes para uma boa cicatrização de defeitos ósseos (11).

2.2.4 XENOENXERTOS

São aqueles tomados a partir de outras espécies: animais, corais ou algas. O osso bovino desproteínizado é um dos substitutos mais bem documentados na literatura mediante estudos histológicos e clínicos que descreveram suas propriedades osteocondutoras (11, 13, 35-37).

Porém, sua reabsorção é uma questão controversa, porque sua capacidade de ser totalmente reabsorvido não é muito bem conhecida, nem se conhece o tempo

necessário para toda a substituição por novo osso formado (11). Os grânulos do biomaterial sofrem uma reabsorção lenta e pobre, por isso que tendem a ser cercados por tecido neoformado em vez de serem reabsorvidos e entrarem no processo fisiológico de remodelação (33, 35). Este comportamento pode ser resultado do tratamento de desproteinização e de esterilização que esses biomateriais sofrem para estarem disponíveis para uso clínico. De fato, a ausência de proteínas é fundamental para evitar reações imunológicas indesejadas e riscos de infecções. Apesar da vantagem de assegurar a remoção de todo o componente orgânico, este tratamento também modifica a estrutura mineral da hidróxiapatita óssea e adquire um potencial reduzido de reabsorção (11). A osteocondutividade e biocompatibilidade são parte das suas vantagens (11, 13, 32).

Os xenoenxertos são considerados uma alternativa aos enxertos autógenos, com vantagens e desvantagens semelhantes às daquelas do aloenxerto (11, 38). Os xenoenxertos mais comumente usados são de origem bovina, suína e equina (39). Têm a vantagem da disponibilidade e de evitar o risco de transmissão de doenças (40).

Os suínos pertencem a uma espécie que compartilha proximidade de anatomia, fisiologia e composição genética com a espécie humana, e tem servido como excelentes doadores de xenoenxerto para receptores humanos (40-42). Os enxertos obtidos desses animais são biocompatíveis, demonstram boa osteocondutividade, causam apenas uma resposta inflamatória no estágio inicial e permitem a rápida formação de tecido granuloso, posteriormente sendo substituído por osso trabecular. Não se observam fibroses entre implantes e osso (41). O xenoenxerto porcino não interfere com a regeneração óssea e integração dos implantes. Apresenta as fases de formação óssea e mostra características semelhantes ao tecido ósseo preexistente (43-45).

Xenoenxerto porcino enriquecido com colágeno pré-hidratado (OsteoBiol® mp3; TecnoSS Dental) é um osso livre de antígeno. Consiste em 90% de grânulos de 600-1000µm, com alta porosidade, misturados com 10% de colágeno do tipo I puro, o que favorece sua reabsorção no leito receptor do enxerto. Assim, levando em consideração a alta taxa de remodelação óssea, o material pode ser usado de forma eficaz (15, 46-48).

Por seu conteúdo de colágeno, o xenoenxerto porcino facilita a coagulação sanguínea e a subsequente invasão de células reparadoras e regenerativas (49). O

desafio é conseguir que as propriedades dos substitutos ósseos melhorem as características necessárias para garantir a formação de novo osso (32, 50). O processo de reabsorção dos xenoenxertos ainda não está muito claro (47).

2.3 BISFOSFONATOS

Os bisfosfonatos (BPs) são drogas cujos efeitos adversos e benefícios são amplamente estudados. São análogos sintéticos dos pirofosfatos e constituem a primeira linha de tratamento para distúrbios ósseos como osteoporose, doença de Paget, displasia fibrosa, câncer de osso, e inflamações relacionadas com perda óssea (51-53). Diferentemente dos pirofosfatos, os BPs apresentam uma cadeia de carbono em vez de uma molécula de oxigênio, originando a ligação P-C-P, o que quer dizer que tem uma molécula central de carbono (C) vinculada a dois átomos de fósforo (P), e mais duas cadeias laterais (R1 e R2) que habilitam a síntese de numerosos componentes com diferentes propriedades (54). A substituição por hidroxila em R1 aumenta a afinidade de BPs pelos cristais de cálcio, enquanto que a presença do átomo de nitrogênio em R2 aumenta seu potencial e determina seu mecanismo de ação (53).

Os BPs são inibidores efetivos da reabsorção óssea dependendo de suas doses (53). Sua estrutura permite que ocorra ligação com os cristais de hidroxiapatita e que a presença de nitrogênio nos dois lados de essa cadeia aumente ainda mais o potencial farmacológico da droga (55, 56).

Os BPs podem ser classificados em aqueles que contêm nitrogênio como risedronato, zoledronato, ibandronato e o alendronato, e os que contêm nitrogênio como etidronato, clodronato e tiludronato (53, 56). Os BPs que contêm nitrogênio são mais potentes na inibição da reabsorção óssea (29). No geral os efeitos farmacológicos no osso parecem depender de duas propriedades chave: afinidade pelo mineral osso e efeito inibitório em osteoclastos (57).

Quando são administrados sistemicamente, os BPs nitrogenados são adsorvidos, entram em contato extracelular próximo aos osteoclastos,

osteoblastos e osteócitos. O pH ácido na lacuna de reabsorção óssea promovido pelos osteoclastos causa a dissociação dos BPs da superfície óssea, seguida da captação primária intracelular em osteoclastos por endocitose (58, 59) induzindo severos distúrbios em seu metabolismo celular e na sua função de reabsorção (60, 61).

Seu principal mecanismo de ação é bloquear a formação de intermediários na via de biossíntese de mevalonato, o que leva à síntese de colesterol e outros esteróis. É assim que inibe a síntese da enzima farnesil pirofosfato (FPPS), enzima chave de ponto de ramificação na via do mevalonato, que gera lipídeos isoprenóides utilizados na síntese de esteróis, e induz a modificação pós-tradução de ligações de GTP, proteínas essenciais para a função dos osteoclastos (57, 62), o que leva a uma resposta inflamatória de fase aguda e à produção de Apppl (um análogo de ATP não hidrolisável) que inibe a translocação de nucleotídeos de adenina mitocondrial e pode resultar em apoptose (63).

Os BPs inibem a reabsorção óssea e reduzem a atividade dos osteoclastos, diminuem a expressão do ativador do receptor do ligando NF-kappa B (RANKL) e aumentam a expressão da osteoprotegerina (OPG) (64).

A sua ação não se limita aos osteoclastos mas se menciona que também há ação sobre osteoblastos e dos osteócitos e, inclusive, que o tipo de ação que provoca pode ser condicionada pela dose de administração (65, 66), já que baixas doses tem demonstrado exercer efeitos benéficos sobre os osteoblastos (65). Os BPs nitrogenados previnem a apoptose de osteoblastos e osteócitos, que têm uma dependência na expressão de conexina 43 (57, 64)

Sabe-se também que os BPs nitrogenados aumentam a proliferação e diferenciação dos osteoblastos (67, 68). e inibem a apoptose de osteócitos e osteoblastos (52, 64). O efeito contra a apoptose é independente do efeito nos osteoclastos, sendo melhor quando são administrados com menor dosagem, o que abre novas possibilidades terapêuticas para os BPs (64).

A administração de BPs aumenta a expressão de marcadores e promotores de diferenciação de osteoblastos, promovendo reparação de defeitos em calvária de ratos (60). Esta característica sugere que poderia ter resultados positivos na regeneração óssea através de xenoenxertos, que são os substitutos ósseos mais

usados atualmente, uma vez que a evidência científica sugere que o papel dos BPs vai além da influência nos osteoclastos (52, 54). Diferentes estudos mostram que a adição de BPs estimula a formação óssea para a substituição de xenoenxertos (69) (70).

O alendronato sódico tem sido utilizado com sucesso para reduzir o risco de fratura e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Apesar de ser muito estudado, ainda há muitos aspectos desconhecidos sobre seu papel na fisiologia óssea (71, 72).

O uso de alendronatos melhora a reparação e remodelação óssea (73, 74). O alendronato administrado local e sistemicamente em ratos com defeitos críticos de 5mm em calvária, preenchidos com auto enxertos, provocou aumento significativo no número de osteoblastos, ao contrário dos casos em que apenas foi colocado no auto enxerto, o que sugere que a droga promove a formação de novo osso (29). Resultados semelhantes foram observados em estudos em fêmures de ratos com auto enxertos (75); também há evidência de diferença na densidade de osso formado em distrações ósseas realizadas em coelhos quando é usado alendronato (76).

Os estudos indicam que a baixa dosagem é a mais indicada para obter efeitos positivos na reparação e formação óssea em defeitos críticos (72-74, 77-79).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 PROPOSIÇÃO GERAL

O objetivo do presente estudo é investigar, através de análise histológica e imuno-histoquímica em microscopia de luz, o efeito do alendronato, administrado local ou sistemicamente, na reparação óssea de defeitos críticos em osso parietal de ratos, preenchidos com xenoenxerto porcino.

3.2 PROPOSIÇÕES ESPECÍFICAS:

- Análise histológica do padrão de reparação de defeitos tratados com xenoenxerto porcino.
- Detectar a presença de osteoclastos por meio de método histoquímico TRAP em microscopia de luz.
- Estudar a imunomarcagem de osteopontina (OPN), no processo de formação óssea em defeitos críticos preenchidos com xenoenxerto porcino.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida de acordo com os princípios éticos e legais de pesquisa de uso de animais, Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo-FOUSP, em reunião de 08/05/2017 (Anexo A)

Para o estudo foram utilizados 60 ratos adultos Wistar albinos, machos, com peso entre 300-400g. Durante os experimentos, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Biologia Oral, em salas com temperatura e umidade controladas, e ciclos de luz de 12 em 12 horas, recebendo água e ração *ad libitum* (22).

Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos:

- **Grupo controle** (n=20): receberam xenoenxerto sem administração de alendronato sódico (GC)
- **Grupo experimental 1** (n=20) receberam xenoenxerto com a administração local de alendronato sódico (XE-ALNL)
- **Grupo experimental 2** (n=20): receberam xenoenxerto com a administração sistêmica de alendronato sódico (XE-ALNS)

Cada grupo de estudo foi dividido por sua vez aleatoriamente em dois grupos: no primeiro grupo os animais foram sacrificados após 30 dias, e, o segundo grupo após 60 dias para a coleta de amostras (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Grupos experimentais

CÓDIGO DO GRUPO	NÚMERO DE RATOS	TRATAMENTO	TEMPO
GC	10	Xenoenxerto sem Alendronato sódico	30 dias
	10	Xenoenxerto sem Alendronato sódico	60 dias
XE-ALNL	10	Xenoenxerto + Alendronato sódico local	30 dias
	10	Xenoenxerto + Alendronato sódico local	60 dias
XE-ALNS	10	Xenoenxerto + Alendronato sódico sistêmico	30 dias
	10	Xenoenxerto + Alendronato sódico sistêmico	60 dias

Fonte: a autora

4.1 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

No dia zero, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de Cloridrato de Ketamina (0.85 ml/Kg) (Dopalen, Vetbrands, Brasil) e xilazina (0.85 ml/kg) (Anasedan, Vetbrands, Brasil) (22) em proporção de 1:1 (80). Foi feita a tricotomia no sítio cirúrgico com lâmina de barbear e desinfecção com gliconato de clorexidina 0,2%. Na pele foi realizada uma incisão longitudinal de 20 mm, que permitiu levantar um retalho incluindo o periósteo. Com a calvaria exposta, foi confeccionado um defeito no osso parietal do lado direito, de 5 mm de diâmetro externo com uma trefina cirúrgica (Dentoflex, Brasil), montada num motor operado a 800 rpm (Driller, Carapicuíba, SP, Brasil), usando baixa velocidade e constante irrigação com solução salina estéril (22), tendo muito cuidado para não danificar a duramáter (29) (Figura 4.1). Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pela investigadora com calibração previa.

Figura 4.1 - Defeito ósseo crítico unilateral em osso parietal.



Fonte: a autora

No grupo experimental XE-ALNL, previamente ao posicionamento no sítio cirúrgico, os xenoinxertos porcinos foram embebidos em solução de alendronato 1 mg/ml (em tampão fosfato 0.1M) durante 5 minutos (29), e não foram lavados antes da sua colocação no defeito.

No grupo experimental XE-ALNS e GC, o defeito foi preenchido (Figura 4.2) com Xenoinxerto porcino (OsteoBiol® mp3; TecnoDental, Italia).

Figura 4.2 – Defeito ósseo tratado com xenoenxerto porcino



Fonte: a autora

Nos três grupos, depois de colocado, o enxerto foi coberto por membrana de colágeno de pericárdio porcino (OsteoBiol® evolution; TecnoSS Dental, Italia). Os tecidos moles finalmente foram reposicionados e suturados com fio de nylon monofilamento 4-0 (Ethilon), e limpos com solução fisiológica (Figura 4.3).

Figura 4.3 - Membrana de colágeno cobrindo o enxerto



Fonte: a autora

Como cuidado pós-operatório foi administrado pela via subcutânea 10 µl de dipirona sódica (D-500®, Zoetis) para analgesia.

O antibiótico não foi utilizado por ser ratos adultos saudáveis e o procedimento cirúrgico ter sido desenvolvido com cuidados de assepsia. Além disso procurou-se evitar a administração de substâncias que poderiam interferir com a avaliação do estudo.

Cada grupo de estudo foi dividido por sua vez aleatoriamente em dois grupos. No primeiro grupo os animais foram sacrificados após 30 dias, e, no segundo grupo após 60 dias para a coleta de amostras.

4.2 ALENDRONATO SÓDICO SISTÊMICO

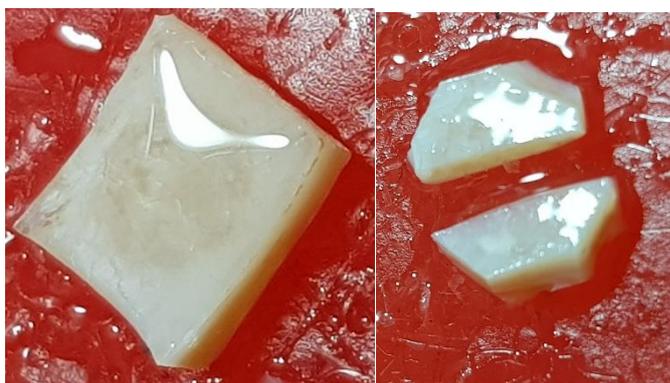
Os ratos do grupo experimental XE-ALNS foram tratados durante 7 dias, previamente ao procedimento cirúrgico, com alendronato sódico na dose de 2,5 mg/kg/d (81) (23). A massa corporal dos animais foi medida no primeiro dia de injeção nos animais usando uma balança digital. As soluções de alendronato foram preparadas utilizando PBS como veículo. Os animais receberam injeções subcutâneas no dorso em um volume de 10 µl de solução. Após à cirurgia foi continuada a administração do fármaco durante 30 ou 60 dias, conforme o grupo. Nos animais do grupo controle, foi injetado o mesmo volume de solução salina.

4.3 OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES E FIXAÇÃO

Ao final de cada tempo estabelecido, os animais foram anestesiados, como foi descrito, e sacrificados. Os defeitos e as áreas vizinhas foram removidos em bloco. Os blocos foram fixados em uma solução de glutaraldeído a 0,1% e formaldeído a 4%, tamponados em 0,1M de tampão fosfato, pH 7,2. Os espécimes foram imersos na solução fixadora à temperatura ambiente e, a seguir, submetidos à irradiação de microondas em forno de laboratório Pelco 3440 (Ted Pella, Redding, C.A. EUA.), a uma temperatura máxima de 37°C. O material foi exposto a 3 ciclos de 5 minutos a 100% de potência (82). Em seguida este material foi imerso em nova solução fixadora,

ficando over night, para depois ser lavado em tampão fosfato 0,05 M, 5 vezes por 10 minutos. Após este procedimento, o material foi descalcificado em EDTA (Titriplex® III, Merck) (a 4,13%, pH 7,2 durante 45 cinco dias. As amostras foram reduzidas de seu tamanho e permaneceram mais um dia no EDTA, para finalmente serem desidratadas em concentrações crescentes de etanol e embebidas em Paraplast X-TRA® (SIGMA-ALDRICH) (Figura 4.1).

Figura 4.4 - Redução do tamanho dos espécimes previa imersão em parafina



Fonte: a autora

Dos blocos foram obtidos cortes de 4,5 μ m de espessura usando um micrótomo (Microm HM-360, Alemanha) (22, 23).

4.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Para a análise histológica foi feita coloração com hematoxilina e eosina seguindo os seguintes passos: desparafinização, hidratação em concentrações decrescentes de etanol, lavagem em água destilada, coloração pela hematoxilina, lavagem, coloração pela eosina, lavagem, desidratação em concentrações crescentes de álcool, diafanização em xilol e montagem em resina sintética (Entellan EMS, Hatfield, PA, EUA).

Para a coloração com tricrômico de Mallory, as lâminas foram desparafinizadas na estufa a 60°C por 60 minutos e tratadas com xilol duas vezes por 10 minutos cada. Depois foram hidratadas em concentrações decrescentes de etanol. Finalmente, para serem coradas, foram expostas por 2 minutos à Solução A, seguindo com três

imersões em água destilada, depois 30 minutos na Solução B. O processo de desidratação foi realizado em concentrações crescentes de etanol. A diafanização foi feita em xilol. As lâminas foram montadas em Entellan (EMS, Hatfield PA, EUA) e examinadas em um microscópio de luz Olympus BX-60.

A análise histológica das lâminas foi realizada por um único examinador. As imagens foram obtidas em um microscópio de luz Olympus (BX-60 - Japan), equipado com sistema de captura de imagem Cell F (23).

4.5 HISTOQUÍMICA PARA TRAP

Para o procedimento os cortes foram desparafinizados e incubados no meio de Burstone para fosfatase ácida, que foi preparado dissolvendo-se 4 mg de naphthol AS-BI phosphate substrate (SIGMA) em 0,25 ml de N-dimetil-formamida (SIGMA), adicionando a seguir 25 ml de tampão acetato 0,2M pH 5,0, 35mg de "Fast Red Violet" LB Salt (SIGMA), e 2 gotas de MgCl a 10%. Em seguida, esta solução em jarra Coplin foi filtrada e aquecida a 37°C em banho maria por 5 minutos, e à mesma foi adicionado D (-) ácido tartárico (SIGMA) 0,2352g . As lâminas foram incubadas por 3h. Depois da incubação, as lâminas foram lavadas em água corrente e secas em temperatura ambiente. Depois foram contra-coradas com solução alcoólica de hematoxilina de Harris a 10% e finalmente desidratadas com uma sequência crescente de etanol e diafanizadas em xilol. As lâminas foram montadas em Entellan (EMS, Hatfield, PA, EUA) e examinadas em um microscópio de luz Olympus BX-60 (23).

4.6 DETECÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE OSTEOPONTINA

Os cortes de 4,5 µm das mostras, foram coletados sobre lâminas de vidro previamente silanizadas pela solução de 3-aminopropytriethoxy-silane (Sigma Chemical CO, St Louis, Mo/EUA) a 20% em álcool absoluto.

Para o procedimento foram desparafinizados em xilol, a 60°C e em seguida à temperatura ambiente e finalmente hidratados em concentrações decrescentes de etanol. Com a finalidade de se remover o pigmento do fixador, os cortes foram imersos

em solução preparada com hidróxido de sódio a 10% e álcool absoluto (1:1) durante 5 minutos.

Posteriormente, foram lavados em água destilada, antes do bloqueio da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio a 30% e metanol (1:1). Os cortes tiveram duas passagens por água destilada e, posteriormente, imersos em dois banhos de solução de Tris pH 7,4, por 2 minutos cada.

Os cortes foram incubados em anticorpo monoclonal IgG₁ (anti OPN Santa Cruz Biotechnology; 21742, CA, EUA), em uma concentração de 1:1000 por 3 horas, à temperatura ambiente dentro de câmara úmida, para posteriormente serem lavados em solução Tris pH 7,4. A detecção foi conseguida em similares condições com os anticorpos de cabra (Dako, EnVision + Dual Link System-HRP, CA, EUA,) por 30 minutos. Depois foram imersos em dois banhos de solução de Tris pH 7,4, por 5 minutos cada.

Para revelação, foi utilizado o cromógeno diaminobenzidina (DAB, 3,3'-diaminobenzidina, Dako) seguindo as orientações do fabricante. Após a lavagem em solução de Tris pH 7,4, os cortes foram contra corados com hematoxilina de Mayer.

Finalizada a contracoloração, os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol. As lâminas foram montadas em Entellan (EMS, Hatfield, PA, EUA) e examinadas em um microscópio de luz Olympus BX-60 (23).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOQUÍMICA (TRAP)

Nenhum dos grupos apresentou fechamento completo do defeito ósseo. Em geral, o xenoenxerto colocado no defeito manteve-se presente em todos os grupos de estudo.

5.1.1 Período de 30 dias

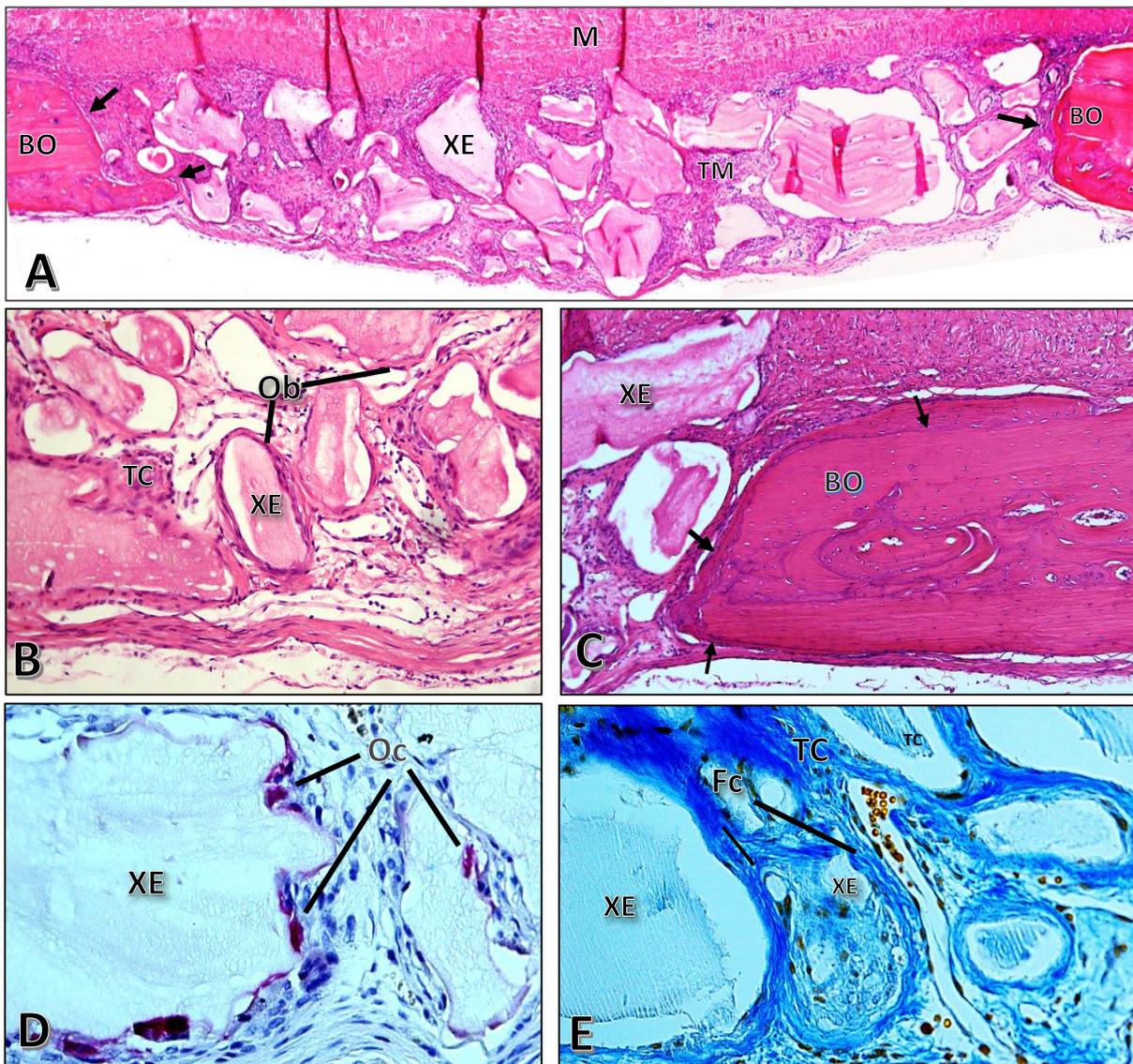
No **grupo controle (GC)** observou-se tecido ósseo primário nas bordas que limitam o defeito, mostrando formação óssea em relação à superfície interna do osso parietal (adjacente à dura-máter). Assim, o osso formado foi observado como curta projeção em direção à parte central da área do defeito. O xenoenxerto apresentou-se na forma de grânulos envolvidos por abundante tecido conjuntivo. No interior do defeito, isto é, ao redor dos grânulos do xenoenxerto, não foram observadas trabéculas ósseas (Figura 5.1 A, B, C).

Alguns espécimes apresentaram osteoclastos, evidenciados na técnica histoquímica TRAP, aderidos às superfícies dos grânulos de enxerto (Figura 5.1 D).

Com a coloração de Tricrômico de Mallory foram evidenciadas fibras colágenas constituindo o tecido conjuntivo que preenchia as regiões entre os grânulos de enxerto, sem organização definida (Figura 5.1 E).

Na análise do padrão de formação de osso primário representado na Figura 5.1A e utilizando o programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) foi determinada a quantidade de osso primário formado, que corresponde a 1,2 % da área total de defeito, neste caso localizado nas bordas que limitam o defeito.

Figura 5.1 - GRUPO CONTROL 30 DIAS: Em A, observa-se as bordas de osso (BO) do defeito com formação de osso primário (seta). Os grânulos de xenoenxerto (XE) apresentam-se com um tamanho heterogêneo, entre 600 µm e 1000 µm, observando-se entre eles abundante tecido conjuntivo (TC). Na borda superior note-se a presença da membrana de colágeno (M) perfeitamente localizada e limitando a área do defeito. Em B, aparecem em maior aumento os grânulos de enxerto e o tecido conjuntivo (TC) circundante, com alguns osteoblastos (Ob) em contato com os grânulos. Em C, observa-se tecido ósseo primário depositado sobre as bordas do defeito (seta). Em D, osteoclastos (Oc) TRAP-positivos adjacentes aos grânulos de enxerto. Em E, tecido conjuntivo entre os grânulos do enxerto com fibras colágenas (Fc) evidenciadas em azul pelo tricrômico de Mallory. A, 40x; B, 200x; C, 100x; D, 400x; E 400x.



Fonte: a autora

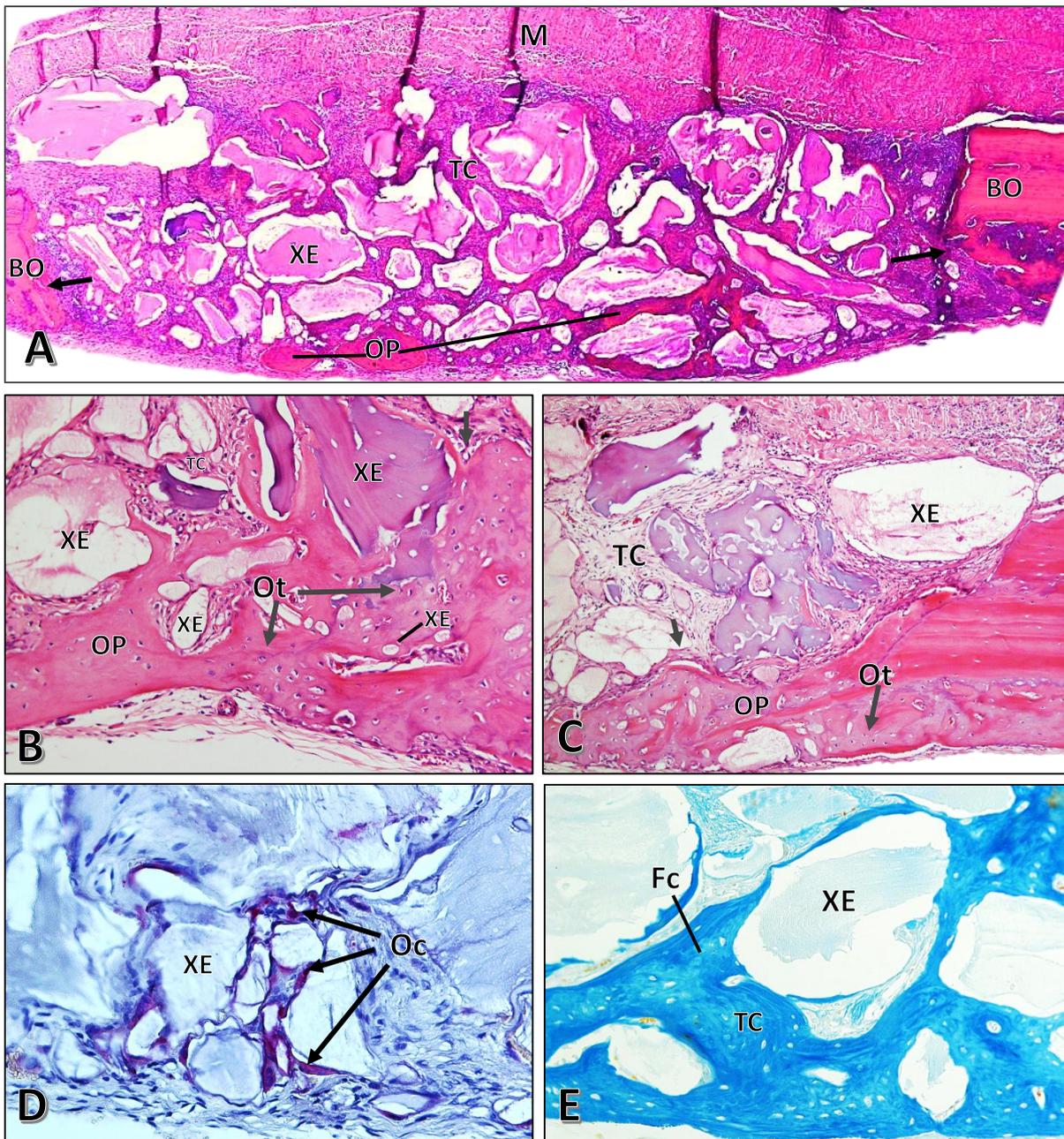
No grupo tratado com **Xenoenxerto mais Alendronato Sódico Local (XE-ALNL)** observou-se formação de osso primário nas bordas que limitam o defeito. Esta formação de osso primário foi evidenciada também ao redor de alguns grânulos de enxerto localizados no terço interno do defeito (adjacente à duramáter). Houve formação de trabéculas de osso primário com presença de osteócitos distribuídos irregularmente na matriz (Figura 5.2 A, B, C).

Alguns espécimes apresentaram osteoclastos, evidenciados pela técnica histoquímica TRAP, aderidos às superfícies dos grânulos de enxerto (Figura 5.2 D).

Com a coloração de tricrômico de Mallory evidenciou-se a presença de fibras colágenas nas áreas de tecido conjuntivo localizadas entre os grânulos de enxerto, sem organização definida. Além disso, alguns grânulos de xenoenxerto apresentaram colágeno da matriz de osso primário depositado sobre sua superfície, também corado em azul (Figura 5.2 E).

Com base à análise do padrão de formação de osso primário, representado na Figura 5.2 A e utilizando o programa ImageJ, observou-se que a quantidade de osso primário correspondeu a 7,2 % da área total de defeito, este localizado nas bordas que limitam o defeito e também ao redor de alguns grânulos de xenoenxerto.

Figura 5.2 - GRUPO TRATADO COM XE-ALNL 30 DIAS: Em A, observa-se as bordas de osso (BO) do defeito com formação de osso primário (OP) (seta). Observa-se também importante formação de osso primário na borda inferior adjacente à dura-máter. Os grânulos de xenoenxerto (XE) apresentam-se com um tamanho heterogêneo, entre 600 µm e 1000 µm. Na borda superior localiza-se a membrana de colágeno (M). Em B, os grânulos de enxerto aparecem com fina camada de osso primário (OP) com presença de osteócitos (Ot), enquanto tecido conjuntivo (TC) preenche as outras regiões. Em C, observa-se tecido ósseo primário depositado sobre as bordas do defeito (seta). Em D, osteoclastos (Oc) TRAP-positivos aderidos aos grânulos de enxerto. Em E, aparecem intensamente coradas em azul pelo tricrômico de Mallory tanto a matriz (Fc) do osso primário na superfície do xenoenxerto como áreas de osso primário da superfície interna do defeito. As fibras colágenas do tecido conjuntivo observam-se levemente coradas. A, 40x; B, 200x; C, 100x; D, 400x; E 200x



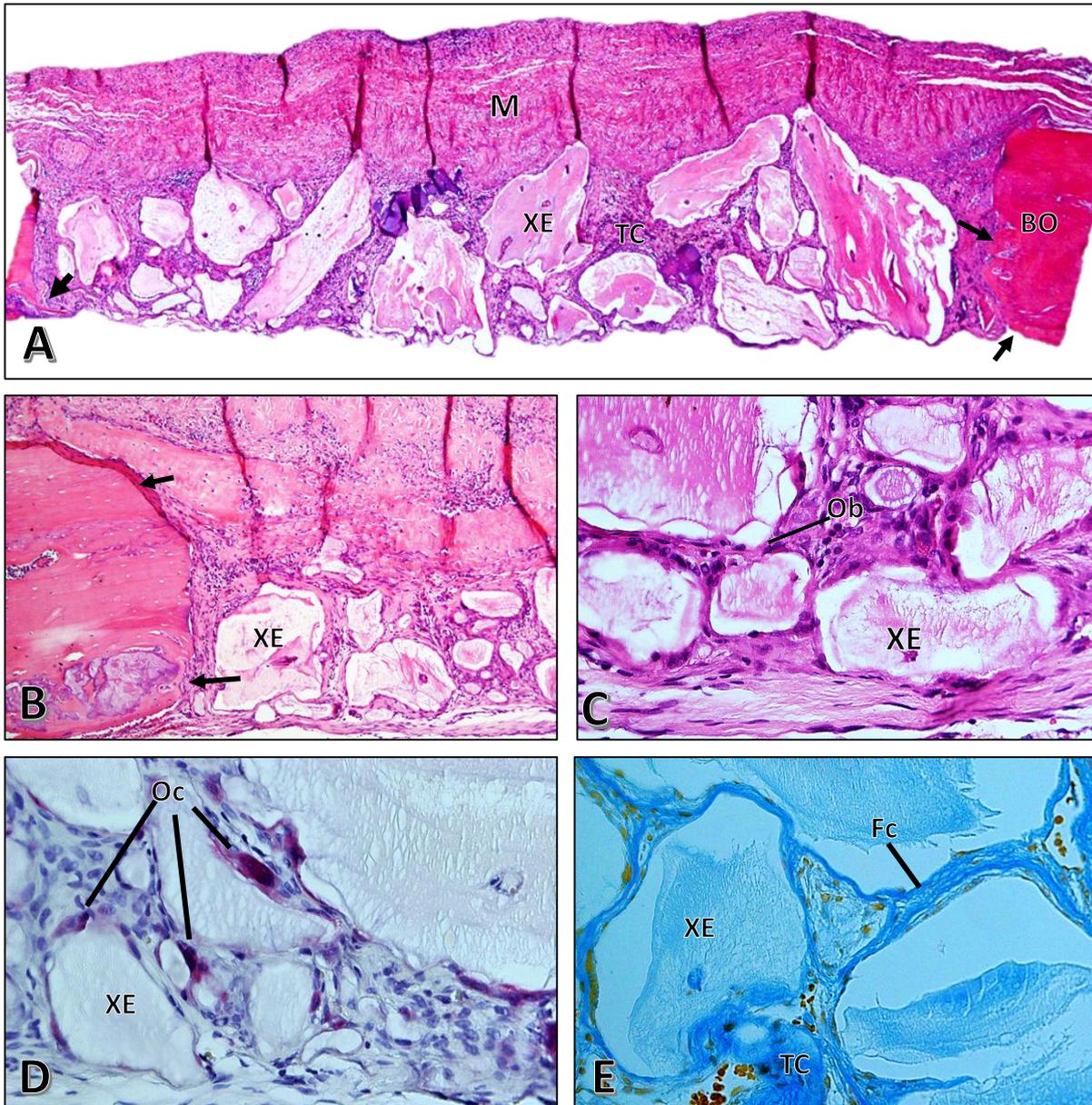
No grupo tratado com **Xenoenxerto mais Alendronato Sódico Sistêmico (XE-ALNS)** observou-se discreta formação de tecido ósseo primário nas bordas que limitam o defeito, sendo este em maior quantidade a partir de sua face interna (adjacente à duramáter). Ao redor dos grânulos de xenoenxerto observou-se abundante tecido conjuntivo. Não se observou formação de trabéculas ósseas na região central do defeito Figura 5.3 A, B, C.

Alguns espécimes apresentaram osteoclastos, evidenciados pela técnica histoquímica TRAP, aderidos às superfícies dos grânulos de enxerto Figura 5.3 D.

Com a coloração de tricrômico de Mallory observou-se a presença de tecido conjuntivo entre os grânulos de enxerto, com fibras colágenas frouxamente dispostas e sem organização definida, (Figura 5.3 E).

Com base a análise do padrão de formação de osso primário mostrado na Figura 5.3 A e utilizando o programa ImageJ, foi determinado que a quantidade de osso primário formado correspondia a 1,18 % da área total de defeito, sempre localizado nas bordas que limitam o defeito.

Figura 5.3 - GRUPO TRATADO COM XE-ALNS 30 DIAS: Em A, observa-se as bordas de osso (BO) do defeito com formação discreta de osso primário (seta). Os grânulos de xenoenxerto (XE) apresentam-se com um tamanho heterogêneo, entre 600 μm e 1000 μm , com abundante tecido conjuntivo (TC) entre eles. Na borda superior note-se a presença da membrana de colágeno (M) limitando a área do defeito. Em B, é observado o osso primário depositado nas bordas do defeito (seta). Em C, alguns osteoblastos são observados em contato os grânulos de enxerto, bem como o tecido conjuntivo (TC) entre eles. Em D, imagem que mostra osteoclastos (Oc) TRAP-positivos aderidos aos grânulos de enxerto. Em E, fibras colágenas do tecido conjuntivo localizado entre os grânulos de enxerto aparecem coradas pelo tricrômico de Mallory. A, 40x; B, 100x; C, 400x; D, 400x; E 400x.



Fonte: a autora

5.1.2 Período 60 dias

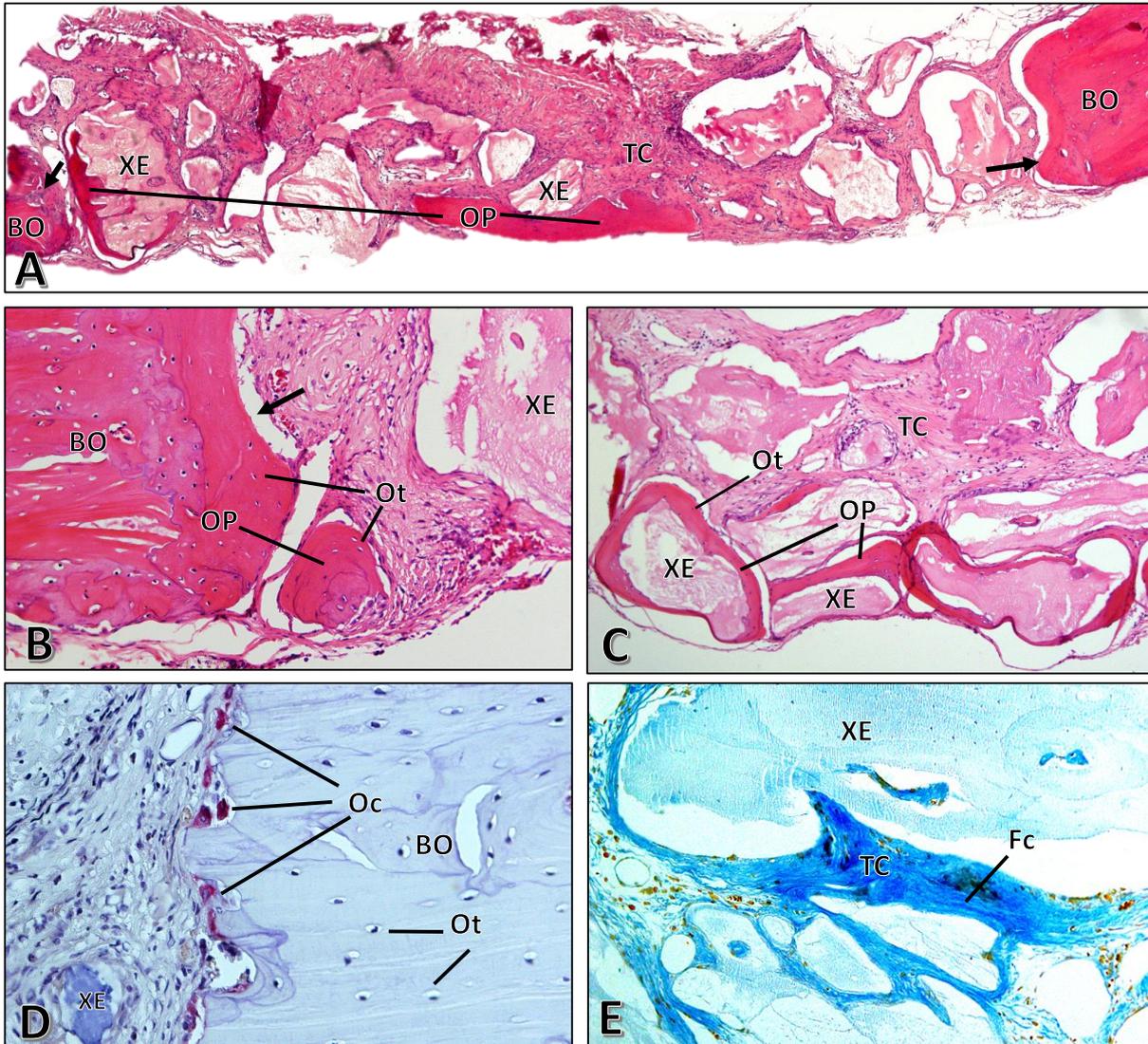
No **grupo controle (GC)** observou-se formação óssea nas bordas que delimitam o defeito, bem como nas regiões centrais do defeito. A formação de osso primário foi evidenciada também ao redor de alguns grânulos de enxerto, onde constituía finas trabéculas ósseas com presença de osteócitos. Essa camada de osso primário estava depositada em estreito contato com a superfície de xenoenxerto (Figura 5.4 A, B, C).

Alguns espécimes apresentaram grânulos de enxerto com osteoclastos aderidos, evidenciados na técnica histoquímica TRAP, aderidos às superfícies dos grânulos de enxerto e as bordas do defeito (Figura 5.4 D).

O tecido conjuntivo presente entre os grânulos de enxerto foi evidenciado com a coloração das suas fibras colágenas pelo tricrômico de Mallory. A matriz de osso primário depositado sobre os grânulos de enxerto, por ser colagenosa, apareceu também evidenciada por essa coloração (Figura 5.4 E).

Com base a análise do padrão de formação de osso primário mostrado na Figura 5.4A e utilizando o programa ImageJ, foi determinado que a quantidade de osso primário formado correspondia a 7,78 % da área total de defeito, localizado nas bordas do defeito e ao redor de alguns grânulos de xenoenxerto.

Figura 5.4 - GRUPO CONTROL 60 DIAS: Em A, observa-se a formação de osso primário (OP) nas bordas de osso (BO) do defeito (seta). Os grânulos de xenoinxerto (XE) apresentam-se com um tamanho heterogêneo, entre 600 µm e 1000 µm de diâmetro, com a presença de tecido conjuntivo (TC) entre eles. Em B, observa-se uma das bordas com tecido ósseo primário sobre a superfície (seta). Em C, com maior aumento se aprecia os grânulos de enxerto rodeados de osso primário com presença de osteócitos (Ot) e tecido conjuntivo (TC). Em D, observa-se osteoclastos (Oc) TRAP-positivos aderidos à borda do enxerto. Em E, fibras colágenas (Fc) tanto do tecido conjuntivo como do osso primário são evidenciadas pelo tricrômico de Mallory. A, 40x; B, 200x; C, 100x; D, 400x; E200x



Fonte: a autora

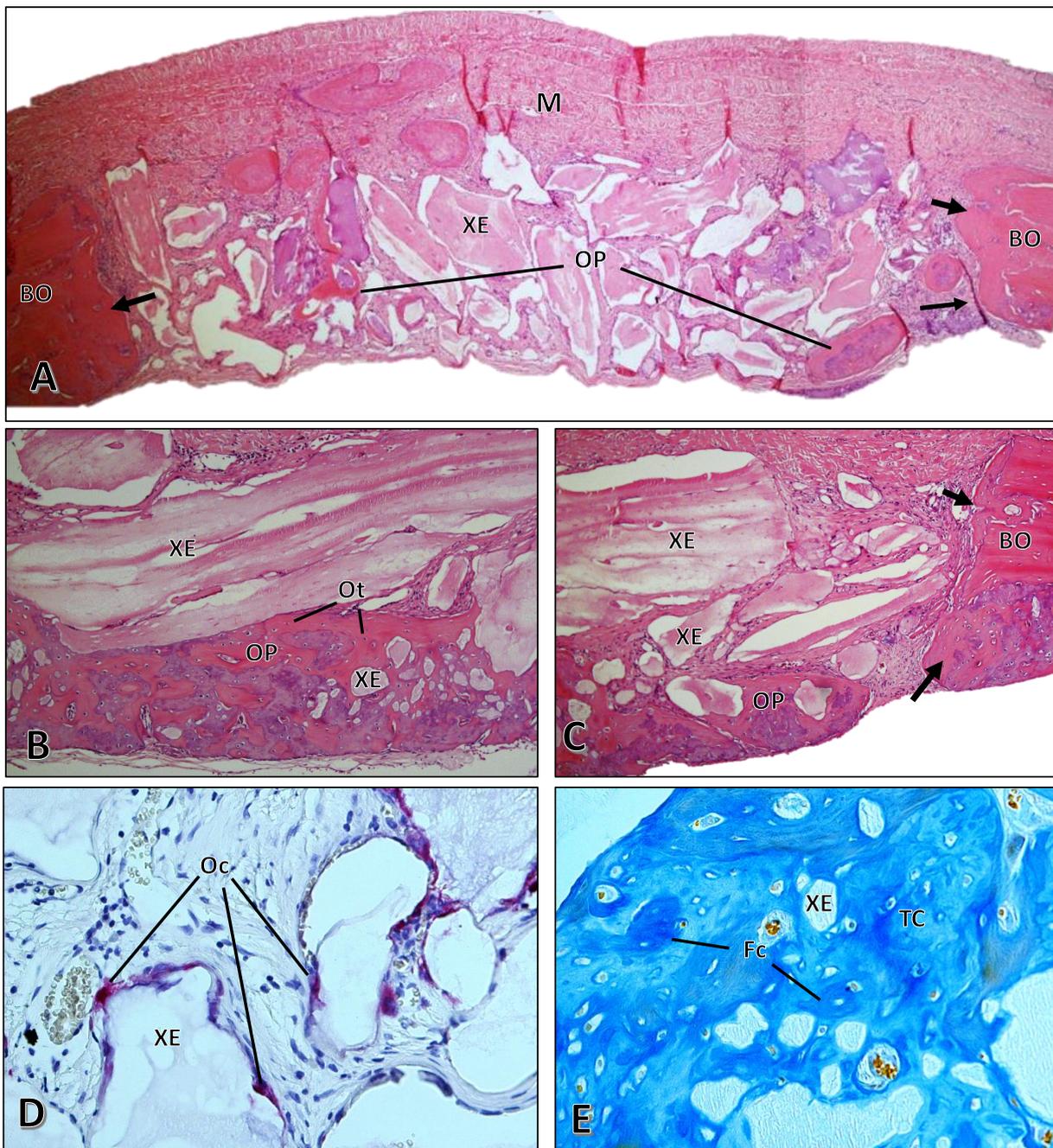
O grupo tratado com **Xenoenxerto mais Alendronato Sódico Local (XE-ALNL)** apresentou maior quantidade de osso primário formado ao redor dos grânulos de enxerto. Esta formação de novo osso observou-se, principalmente, a partir da borda interna do defeito, formando trabéculas ósseas com presença de osteócitos na sua matriz. (Figura 5.5 A, B, C).

Como nos grupos anteriores, alguns grânulos de enxerto apresentavam osteoclastos adjacentes a suas superfícies, os quais foram evidenciados pela técnica histoquímica TRAP, bem como às bordas do osso (Figura 5.5 D).

Com a coloração de tricrômico de Mallory foram claramente detectadas as fibras colágenas tanto do osso primário formado sobre os grânulos de enxerto como do tecido conjuntivo presente entre estes (Figura 5.5 E).

Com base a análise do padrão de formação de osso primário na Figura 5.5 A e utilizando o programa ImageJ, a quantidade de osso primário determinado correspondia a 13.29, % da área total de defeito, localizado nas bordas que limitam o defeito e ao redor de alguns grânulos de xenoenxerto.

Figura 5.5 - GRUPO TRATADO COM XE-ALNL 60 DIAS: Em A, observa-se as bordas de osso (BO) do defeito com formação de osso primário (OP) ao redor (seta) assim como também na borda inferior adjacente a dura-máter importante formação de osso primário, com aspecto trabeculado. Entre os grânulos de xenoenxerto (XE) há presença de tecido conjuntivo (TC), na borda superior localiza-se a membrana de colágeno (M). Em B, observa-se os grânulos de enxerto rodeados de osso primário com presença de osteócitos (Ot), bem como por tecido conjuntivo (TC). Em C, a maior aumento observa-se tecido ósseo primário formado ao redor das bordas do defeito (seta). Em D, imagem que mostra osteoclastos (Oc) TRAP-positivos aderidos a grânulos de xenoenxerto. Em E, matriz colagenosa (Fc) do osso presente ao redor de pequenos grânulos de xenoenxerto. A, 40x; B, 200x; C, 100x; D, 400x; E 200x



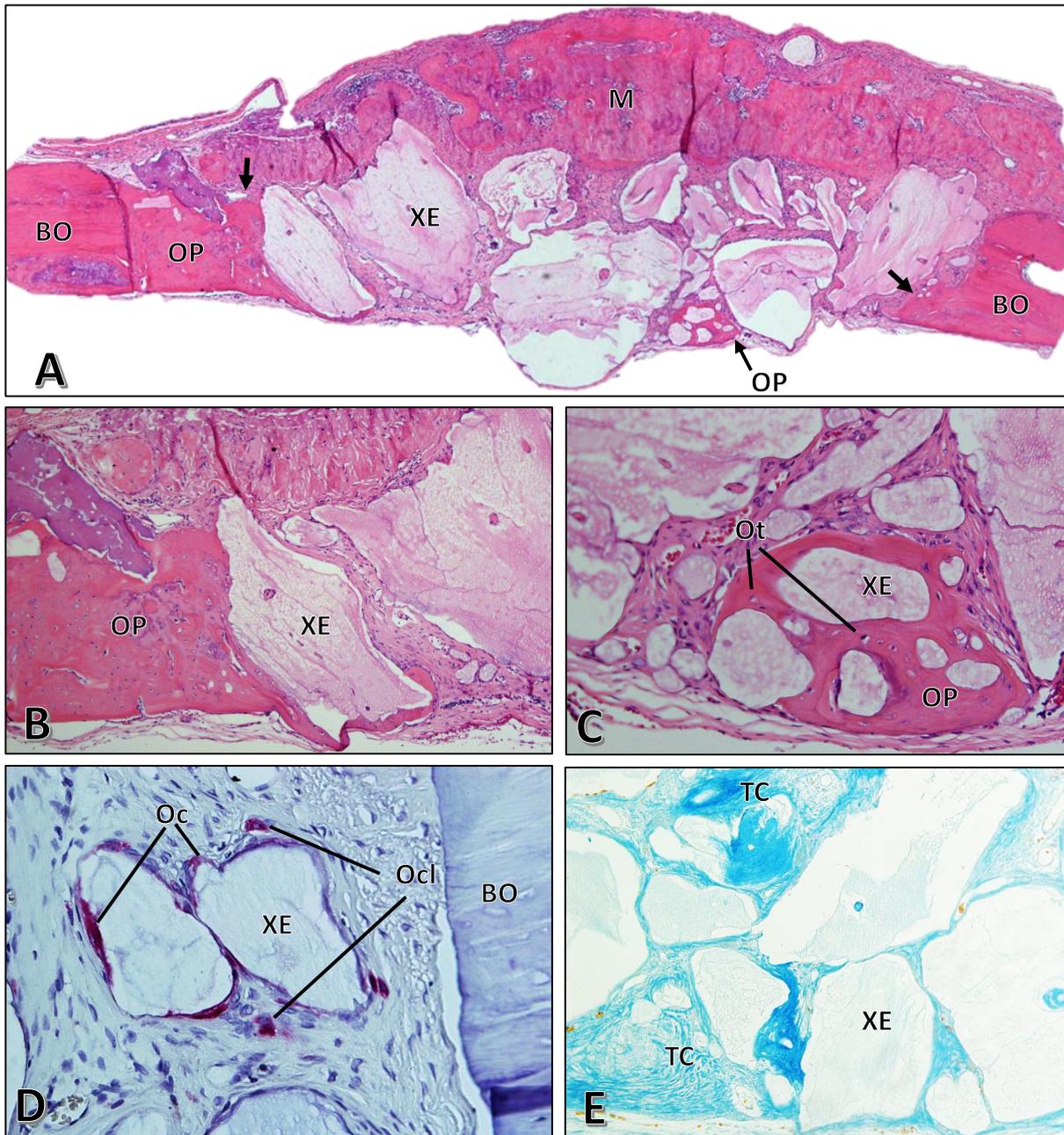
No grupo tratado com **Xenoenxerto mais Alendronato Sódico Sistêmico (XE-ALNS)** apresentou importante formação de osso primário formado ao redor das bordas que limitam o defeito e de alguns grânulos de enxerto (Figura 5.6 A, B, C).

Alguns espécimes apresentaram osteoclastos, evidenciados pela técnica histoquímica TRAP, aderidos às superfícies dos grânulos de enxerto e às bordas ósseas que limitavam o defeito (Figura 5.6 D).

Com a coloração de tricrômico de Mallory observou-se a presença de fibras colágenas de tecido conjuntivo entre os grânulos de enxerto e com maior organização ao redor de alguns grânulos que tem osso primário (Figura 5.6 E).

Com base na análise do padrão de formação de osso primário mostrado na Figura 5.6A e utilizando o programa ImageJ, foi determinado que a quantidade de osso primário formado correspondia a 9,18 % da área total de defeito, localizado nas bordas que limitam o defeito e ao redor de alguns grânulos grânulos de xenoenxerto.

Figura 5.6 - GRUPO TRATADO COM XE-ALNS 60 DIAS: Em A, observa-se as bordas de osso (BO) do defeito com formação de osso primário (seta). Os grânulos de xenoenxerto (XE) apresentam-se com um tamanho heterogêneo entre 600 µm e 1000 µm de diâmetro, com presença de tecido conjuntivo (TC) entre eles, e em alguns, tecido ósseo primário ao redor. Na borda superior note-se a presença da membrana de colágeno (M) limitando a área de enxerto. Em B, observa-se a formação de osso primário a partir da borda do defeito (seta). Em C, com maior aumento se aprecia os grânulos de enxerto rodeados de osso primário (OP) e tecido conjuntivo (TC) entre eles. Em D, imagem que mostra dois grânulos de enxerto com osteoclastos TRAP-positivos, alguns aderidos (Oc), e outros latentes (Ocl). Em E, tricômico de Mallory mostrando a presença entre os grânulos de tecido conjuntivo com fibras colágenas. A, 40x; B, 100x; C, 100x; D, 400x; E, 200x.

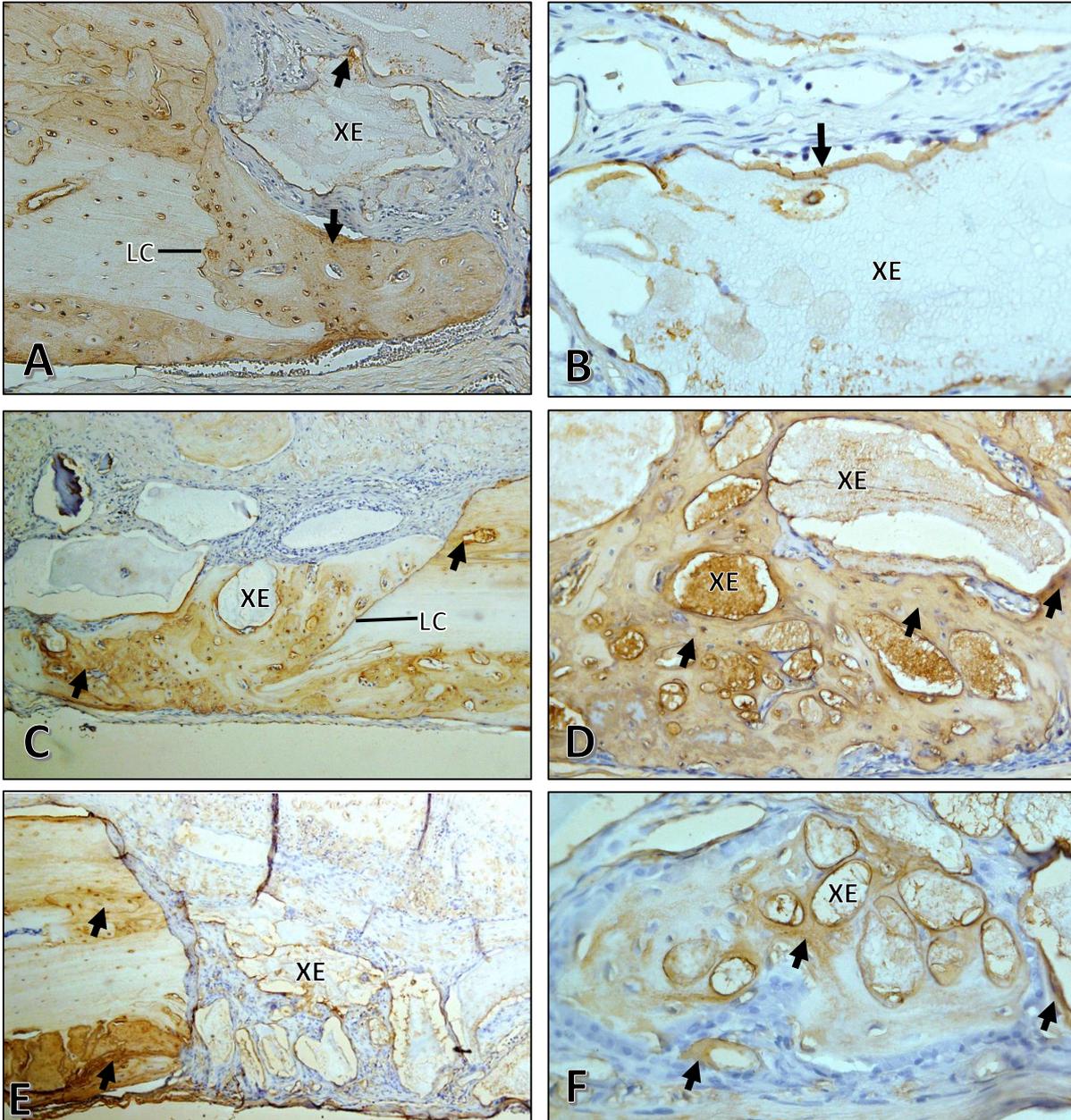


5.2 ANÁLISE OSTEOPONTINA

A imunomarcagem para osteopontina revelou a presença desta proteína não colágena no osso primário formado sobre as bordas dos defeitos, bem como ao redor de alguns grânulos de xenoinxerto. Dessa maneira, foi possível avaliar a qualidade do osso formado, que foi do tipo primário, mesmo no período mais longo de experimentação (60 dias), revelando a escassa remodelação óssea (Figs 5.7 e 5.8).

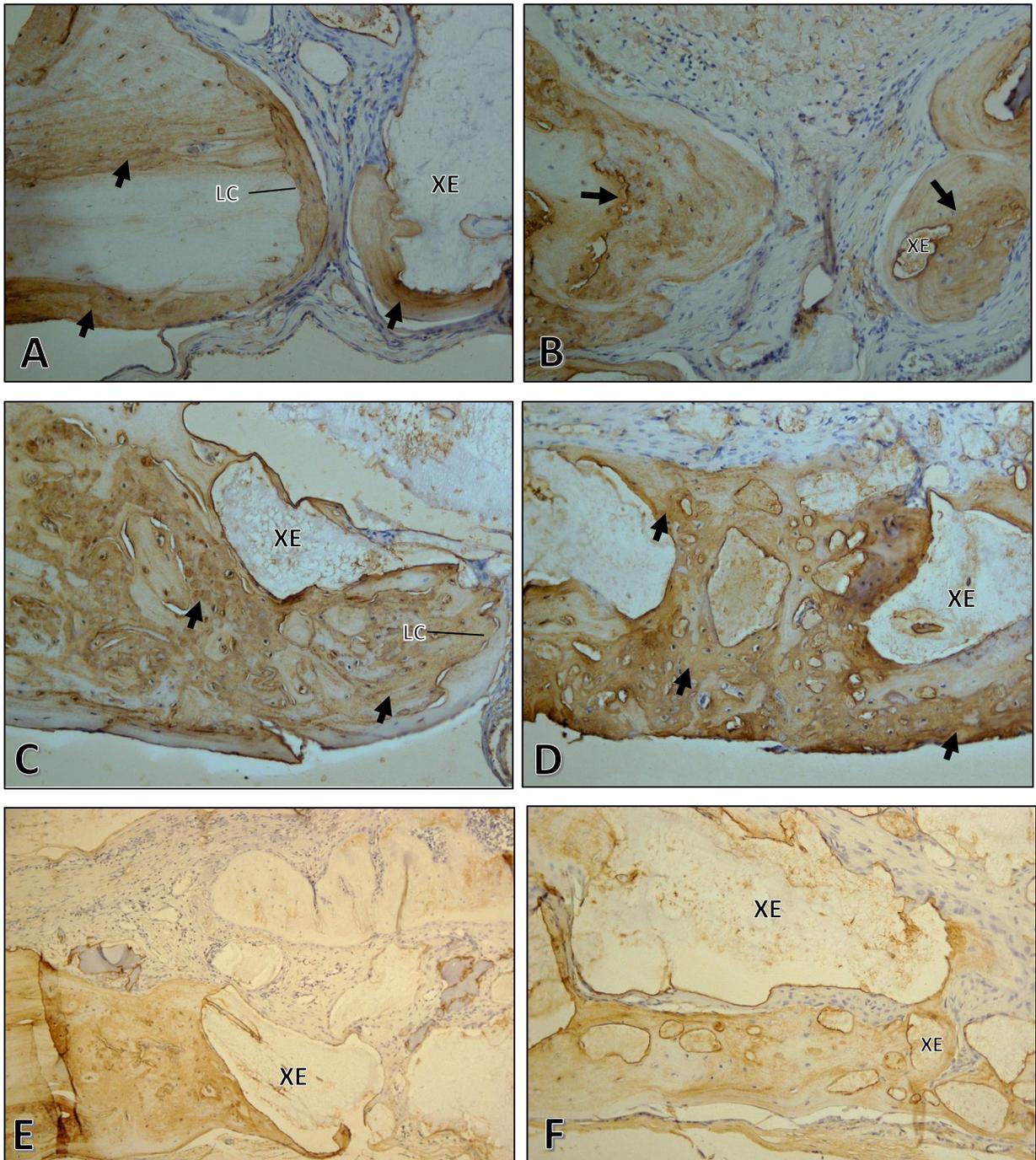
Deve ser salientado que ao redor dos grânulos de xenoinxerto apareceu uma linha imunopositiva para OPN, revelando a deposição desta proteína, formando uma linha cimentante entre o enxerto e a matriz de osso primário depositado ao seu redor (Fig. 5.7B).

Figura 5.7 - Imuno-histoquímica para Osteopontina (OPN): grupos de estudo a 30 dias GC: em A, B; grupo XE-ALNL C, D; grupo XE-ALNS E, F. Observe-se nas marcações (seta) presença da proteína ao redor das bordas e dos grânulos de xenoenxerto (XE). Em C e D note-se marcação da proteína em osso primário formado ao redor dos grânulos de xenoenxerto. Aumento: A, 200x; B, 400x; C, 100x; D, 200x; E100x; F400x.



Fuente: a autora

Figura 5.8 - Imuno-histoquímica para Osteopontina (OPN): grupos de estudo a 60 dias: grupo GC em A, B; grupo XE-ALNL C, D; grupo XE-ALNS E, F. Observe-se nas marcações (seta) presença da proteína OPN no osso primário formado ao redor das bordas e dos grânulos de xenoinxerto (XE) evidenciando uma maior integração do xenoinxerto. Nas bordas em A, C e E pode-se observar formação de linhas cimentantes. Aumento 100x



Fonte: a autora

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que a aplicação local de alendronato, hidratando o xenoenxerto porcino previamente ao preenchimento no defeito crítico, resultou em maior formação óssea que aquela encontrada quando os animais foram tratados sistemicamente com a droga e que nos animais não tratados com o BPs.

Neste estudo para analisar o efeito do uso de alendronato sódico administrado de maneira local e sistemicamente na regeneração óssea de defeitos se utilizou um modelo animal no qual defeitos críticos de 5mm de diâmetro foram criados no osso parietal de ratos, para, assim, avaliar o processo de regeneração óssea com xenoenxerto, biomaterial usado para tratar defeitos deste tipo (29, 83-86) (22, 60, 72). Deve ser mencionado que alguns estudos utilizam defeitos de 8mm de diâmetro, porém, considerando os dois ossos parietais como sendo um só (87). O presente estudo utilizou apenas um osso parietal para não incluir a sutura interparietal na área analisada. É sabido que células indiferenciadas estão presentes nas suturas, as quais podem interferir na análise da formação óssea no defeito.

Foram avaliados os defeitos em regeneração após 30 e 60 dias, períodos que a literatura relata para analisar a capacidade osteocondutiva dos xenoenxertos (32, 87), bem como para avaliar o processo de regeneração óssea com efeito de diversas drogas (22, 29, 70, 77, 88).

O xenoenxerto porcino usado tem evidência de ser biocompatível, bioabsorvível e osteocondutivo participando do processo normal de reparação óssea (7, 40, 45, 70). Além disso, o tamanho de seus grânulos, as características da superfície, e densidade em comparação a outros enxertos aloplásticos se evidência como uma vantagem para a avaliação da resposta biológica, (89). Em contraste, foi recentemente relatado que o uso de xenoenxerto em defeitos de 8mm recobertos com membrana colágeno demonstra pobres propriedades osteocondutivas com baixa quantidade de novo osso formado ao redor dos grânulos de xenoenxerto porcino (87).

O efeito dos BPs pode variar do acordo ao tipo e método de administração, bem como a concentração (90). A via de administração sistêmica e a dose de alendronato utilizada nos estudos publicados varia muito, descrevendo-se, por exemplo, que com doses de 0,01 mg/Kg não existe efeito na reabsorção e deposição

da matriz óssea (72), também que doses de 0,5 mg/Kg reduzem a reabsorção óssea e não decrescem sua formação (91), ou que a dose de 0,2 mg/Kg gera incremento na reparação e remodelação óssea (73, 75, 92). Também se determina que dosagens de 0,5 mg/Kg até as 3 semanas de administração não tem efeito na formação óssea, porque o efeito só é percebido após 5 semanas, concluindo-se que a efetividade de alendronato é na inibição de perda óssea e não no aumento em quantidade ou densidade óssea (88). Porém, em estudos mais recentes feitos em coelhos na fase de diferenciação celular e organização de tecido determinou-se que na administração profilática de BPs, a dose de 0,5 mg/Kg constitui uma alternativa para a reparação óssea de defeitos craniais, pois incrementa a imunopositividade de TGF- β 1 e a presença de CD34+ e BMP-2 no sítio de reparação (77); entretanto, conclui-se que a dosagem deve ser ainda estudada (72, 75), sobretudo se levarmos em consideração que a dosagem administrada em humanos não pode ser diretamente extrapolada a modelos animais. No presente estudo foi utilizada uma dose de 2,5 mg/Kg que, por ser alta, certamente exerce efeito no processo de reabsorção óssea em ratos, porém, sendo tolerada pelo animal (23) (93).

O alendronato tem sido também usado em estudos com aplicação local, procurando causar um efeito positivo nos processos de regeneração óssea (70, 74, 78, 94, 95); uma das formas de administração é a hidratação do enxerto com dose de 1 mg/ml (29, 96), que foi a usada no presente trabalho.

Os BPs tem afinidade pelo mineral ósseo (97). Estudos propõem que os BPs tem propriedades ósseo estimulantes, evidenciadas pelo aumento da formação da matriz, que promovem a diferenciação osteoblástica em defeitos de osso parietal (60), além de prevenir a apoptose de osteoblastos e melhorar sua função (98, 99). Apesar do conhecido efeito dos BPs na redução da perda óssea (75, 91, 100, 101), estes não impedem a formação de novo osso (91, 102), o que se evidencia tanto em sua aplicação local quanto sistêmica (76).

A análise dos resultados procurou identificar um padrão celular e da matriz extracelular na formação óssea nas variáveis estudadas que foram a administração local e sistêmica de alendronato sódico, para determinar se existe algum efeito no processo de regeneração óssea no modelo proposto. Analisar estatisticamente os resultados neste tipo de estudos tem muitas limitações como são: trabalhar com um número reduzido de ratos em consideração a critérios éticos, as características do modelo experimental, por serem defeitos de forma circular que requerem a análise

somente dos cortes da região central para procurar manter a medida do defeito; esses cortes, tecnicamente, não sempre são possíveis de obter em número suficiente. Além disso, para se ter rigor científico na análise estatística é necessário que o modelo utilizado não tenha estas limitações, que todo fique padronizado, mas no modelo animal, pela fisiologia envolvida, não sempre é possível.

No tempo que os grupos foram estudados nenhum deles apresentou fechamento completo do defeito ósseo. Em geral, o volume de xenoenxerto colocado no defeito manteve-se em todos os grupos de estudo e a membrana de colágeno em todos os casos se manteve em posição. Esses dois fatores contribuíram com o processo de regeneração, inclusive, em certos casos, foi evidente a participação da membrana no processo de regeneração ao ser evidente sua associação às estruturas e ao novo osso. Isso corrobora o fato que a membrana constitui um componente bioativo e não apenas uma barreira passiva (103). Foi também evidente em todos os grupos de estudo que a formação de novo osso ocorreu em aposição às bordas do defeito, com projeção em direção à parte central da área do defeito, mais do que nesta, ou seja, em relação à superfície interna do osso parietal (adjacente à dura-máter).

Os resultados do grupo ALNL mostram que o efeito do alendronato sódico usado na hidratação do xenoenxerto colocado no defeito, provocou maior formação de novo osso tanto ao redor das bordas que limitavam o defeito como de os grânulos de xenoenxerto, em comparação ao GC e grupo ALNS tanto no período de 30 como de 60 dias. Enquanto nos grupos ALNS observou-se menor quantidade de osso primário formado em comparação com os respectivos grupos do ALNL, no dia 30 seu padrão foi similar ao correspondente do grupo controle; porém, no dia 60 se observou maior quantidade de osso novo em relação ao grupo controle de 60 dias. O número de osteoclastos encontrados nestes períodos foi escasso, resultado que difere dos obtidos em estudo com modelo animal similar com fosfato bifásico de cálcio que determinou que a administração de alendronato local ou sistêmico não influencia na regeneração óssea (29) ou ainda com estudos que determinam que apesar de que existe maior formação óssea nos grupos tratados com alendronato comparado com o grupo controle não encontrou diferença entre sua aplicação sistêmica ou local (29, 50, 74).

A administração de alendronato, seja local ou sistemicamente, inibe a atividade osteoclástica. Entretanto, a imunomarcagem para osteopontina revelou imunopositividade na superfície dos grânulos, antes da deposição de osso primário.

Esse achado mostra que os osteoblastos recém-diferenciados depositam essa proteína não colágena, para o estabelecimento de uma linha cimentante (Nanci 1999), antes de iniciar a deposição da matriz óssea como um todo. Esse fato representa uma razão adicional para explicar a escassez de osteoclastos reabsorvendo os grânulos do xenoinxerto.

Ao estudar a distração óssea com administração local e sistêmica do alendronato determinou-se que em termos de efetividade e aceleração de formação de novo osso os grupos tratados com alendronato foi mais efetiva comparado com o grupo controle (76).

A presença de tecido conjuntivo com suas fibras colágenas foi mais bem observado com a coloração histológica de tricrômico de Mallory, além de que a formação de osso primário foi marcada pela presença de OPN, que evidenciou-se presente na matriz óssea, bem como nas correspondentes linhas cimentantes (4), fatos que mostram a evolução de um processo fisiológico de regeneração óssea. Porém, a análise permite determinar que o efeito do alendronato sódico local afeta com sua ação a atividade dos osteoclastos, sem interferir com o processo de formação óssea (29, 77, 104)

Nos espécimes do grupo ALNS 30 dias observou-se discreta formação de tecido ósseo primário nas bordas que limitam o defeito, em quanto ao redor dos grânulos de xenoinxerto observou-se abundante tecido conjuntivo. Nesse grupo não se observou formação de trabéculas ósseas sendo similar ao observado no GC do mesmo tempo. Porém, no grupo ALNS 60 dias, além da formação de novo osso nas bordas, observou-se também formação de osso primário ao redor de alguns grânulos de enxerto, embora tenha sido em menor quantidade que o observado no grupo ALNL nos respectivos tempos, porém maior à observada no GC de 60 dias. A presença de matriz e formação de osso primário foi conferida com a análise histológica de Tricrômico de Mallory, e com análise de imuno-histoquímica para a proteína osteopontina. Essa proteína não colágena é usada como marcador de osso primário, pois neste apresenta-se abundante, devido à rápida deposição em comparação com o osso secundário, no qual a marcação é quase indetectável (4)

A presença dos osteoclastos evidenciados na técnica histoquímica TRAP nos grupos foi adjacente às bordas do osso que limitavam o defeito e somente alguns grânulos do xenoinxerto, que se mostram nas imagens. Não se observou grandes quantidades deles na extensão do enxerto. Foi relatado que os BPs atrasam a

formação óssea inicial e sugere-se que a administração desta droga diminui o número de células TRAP positivas o que estaria relacionado com o atraso inicial da cicatrização (105). É possível que as células clásticas recém fusionadas, quando entram em contato com a superfície óssea sofram interferências do ALN associado à matriz mineralizada, e se tornem latentes (93)

É relatado também que o uso de BPs pode retardar a cicatrização de alvéolos após extração dentária, em etapas iniciais, mas também pode reduzir as alterações dimensionais pós-extração em termos de largura óssea horizontal. Além disso, os BPs parecem que obstruem ou retardam a reabsorção de substituto ósseo porcino (69, 105). Em nossos resultados evidenciou-se maior formação de tecido ósseo nos grupos tratados com alendronato local e sistêmico mais evidente nos grupos de 60 dias comparados com os grupos controle do tempo similar, o que poderia considerar-se como possibilidade é o retardo da reabsorção do substituto ósseo evidenciado na pouca presença de osteoclastos, mais para conferir este fato precisam estudar os mesmos grupos com tempos maiores, com a finalidade de determinar o processo de reabsorção e integração do xenoenxerto na remodelação óssea.

Os resultados obtidos permitem afirmar que o xenoenxerto porcino possui propriedades osteocondutivas e que o uso de alendronato potencializa a formação de novo osso, sendo mais efetivos na sua aplicação local. O que pode ser explicado pelo efeito conservador do alendronato no xenoenxerto prolongando seu efeito osteocondutor, e, portanto, este tipo de xenoenxerto possui a característica de ter uma lenta reabsorção o que pode estar potencializada pela presença do alendronato.

São necessários, entretanto, estudos com tempo mais prolongados, com a finalidade de avaliar o processo de reabsorção do xenoenxerto e de determinar o tempo e a forma como os enxertos são reabsorvidos e substituídos por novo osso formado. É também necessário o estudo de outras doses de aplicação sistêmica do alendronato em este tipo específico de experimentos.

A aplicação local sendo efetiva, poderia ser usada sem causar danos provocados por uma administração sistêmica por várias semanas.

7 CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo é possível concluir que:

- O grupo ALNL mostrou melhor desempenho na formação de osso primário que os grupos XE-ALNS.
- Os grupos XE-ALNS mostraram ter efeito similar que o grupo controle aos 30 dias. Somente no tempo de 60 dias houve aumento na quantidade de osso novo formado em comparação ao grupo controle do mesmo período.
- A presença dos osteoclastos evidenciados na técnica histoquímica TRAP, adjacente aos grânulos do xenoenxerto e das bordas do osso que limitavam o defeito, foi escassa em todos os grupos estudados.
- A imunomarcagem para osteopontina revelou imunopositividade na superfície dos grânulos, antes da deposição da matriz óssea, estabelecendo uma linha cimentante entre eles, bem como na matriz do osso primário.

REFERÊNCIAS¹

1. Arana V, Bradaschia V. *Biologia Celular e Tecidual para Odontologia: Moléculas, Células e Tecidos*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.
2. Fernández-Tresguerres-HErnández-Gil I AGM, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. . Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11:47-51.
3. Katchburian E, Arana V. *Histologia e Embriologia Oral*. 4 ed. Brasil: Guanabara Koogan; 2017 2017.
4. Nanci A. Content and Distribution of Noncollagenous Matrix Proteins in Bone and Cementum: Relationship to Speed of Formation and Collagen Packing Density. *Journal of Structural Biology*. 1999;126(3):256-69.
5. Anderson HC GR, Tague SE. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Frontiers in Bioscience*. 2005;10:822-37.
6. Soltanoff CS, Chen W, Yang S, Li Y-P. Signaling Networks that Control the Lineage Commitment and Differentiation of Bone Cells. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. 2009;19(1):1-46.
7. Calvo Guirado JL, Ramírez Fernández MP, Negri B, Delgado Ruiz RA, Maté Sánchez de-Val JE, Gómez-Moreno G. Experimental Model of Bone Response to Collagenized Xenografts of Porcine Origin (OsteoBioI® mp3): A Radiological and Histomorphometric Study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 2013;15(1):143-51.

¹ De acordo com Estilo Vancouver

8. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2011;26(2):229-38.

9. Fernández-Tresguerres-HErnández-Gil I AGM, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. . Physiological bases of bone re-generation II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11:151-7.

10. Cerri PS, Boabaid F, Katchburian E. Combined TUNEL and TRAP methods suggest that apoptotic bone cells are inside vacuoles of alveolar bone osteoclasts in young rats. *Journal of Periodontal Research*. 2003;38(2):223-6.

11. Zizzari VL, Zara S, Tetè G, Vinci R, Gherlone E, Cataldi A. Biologic and clinical aspects of integration of different bone substitutes in oral surgery: a literature review. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2016;122(4):392-402.

12. Aghaloo TL, Moy PK. Which hard tissue augmentation techniques are the most successful in furnishing bony support for implant placement? *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*. 2007;22:49-73.

13. Benic GI, Hammerle CH. Horizontal bone augmentation by means of guided bone regeneration. *Periodontol 2000*. 2014;66(1):13-40.

14. Akiyoshi F, Tomohiro I, Hajime K, Masahiro Y, Hidetada M. A Novel Combined Surgical Approach to Vertical Alveolar Ridge Augmentation with Titanium Mesh, Resorbable Membrane, and rhPDGF-BB: A Retrospective Consecutive Case Series. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*. 2013;33(4):436-45.

15. Barone A, Aldini NN, Fini M, Giardino R, Calvo Guirado JL, Covani U. Xenograft Versus Extraction Alone for Ridge Preservation After Tooth Removal: A Clinical and Histomorphometric Study. *Journal of Periodontology*. 2008;79(8):1370-7.

16. Ezirganli S, Kazancioglu HO, Mihmanli A, Sharifov R, Aydin MS. Effects of different biomaterials on augmented bone volume resorptions. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(12):1482-8.

17. Hockers T, Abensur D, Valentini P, Legrand R, Hammerle CHF. The combined use of bioresorbable membranes and xenografts or autografts in the treatment of bone defects around implants: A study in beagle dogs. *Clinical Oral Implants Research.* 1999;10(6):487-98.

18. Esposito MA, Koukouloupoulou A, Coulthard P, Worthington HV. Interventions for replacing missing teeth: dental implants in fresh extraction sockets (immediate, immediate-delayed and delayed implants). *Cochrane Database Syst Rev.* 2006(4):CD005968.

19. Yamada M, Egusa H. Current bone substitutes for implant dentistry. *Journal of Prosthodontic Research.* 2018;62(2):152-61.

20. Campana V, Milano G, Pagano E, Barba M, Cicione C, Salonna G, et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine.* 2014;25(10):2445-61.

21. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials.* 2017;2(4):224-47.

22. Ferreira LB, Bradaschia-Correa V, Moreira MM, Marques ND, Arana-Chavez VE. Evaluation of bone repair of critical size defects treated with simvastatin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres in rat calvaria. *J Biomater Appl.* 2015;29(7):965-76.

23. Moreira MM, Bradaschia-Correa V, Marques ND, Ferreira LB, Arana-Chavez VE. Ultrastructural and immunohistochemical study of the effect of sodium alendronate in the progression of experimental periodontitis in rats. *Microsc Res Tech.* 2014;77(11):902-9.
24. Hannink G, Arts JJC. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: What is optimal for bone regeneration? *Injury.* 2011;42:S22-S5.
25. Blokhuis TJ, Arts JJC. Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: Definitions, facts and myths. *Injury.* 2011;42:S26-S9.
26. Urist MR. Bone: Formation by Autoinduction. *Science.* 1965;150(3698):893-9.
27. de Almeida JM, Bosco AF, Faleiros PL, Pazmiño VFC, Murakawa AC, Bonfante S, et al. Effects of oestrogen deficiency and 17 β -estradiol therapy on bone healing in calvarial critical size defects treated with bovine bone graft. *Archives of Oral Biology.* 2015;60(4):631-41.
28. Troeltzsch M, Troeltzsch M, Kauffmann P, Gruber R, Brockmeyer P, Moser N, et al. Clinical efficacy of grafting materials in alveolar ridge augmentation: A systematic review. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery.* 2016;44(10):1618-29.
29. Toker H, Ozdemir H, Ozer H, Eren K. A comparative evaluation of the systemic and local alendronate treatment in synthetic bone graft: a histologic and histomorphometric study in a rat calvarial defect model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012;114(5 Suppl):S146-52.
30. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001;10 Suppl 2:S96-101.

31. Abarrategi A, Lópiz-Morales Y, Ramos V, Civantos A, López-Durán L, Marco F, et al. Chitosan scaffolds for osteochondral tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2010;95A(4):1132-41.
32. Tovar N, Jimbo R, Gangolli R, Perez L, Manne L, Yoo D, et al. Evaluation of bone response to various anorganic bovine bone xenografts: an experimental calvaria defect study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014;43(2):251-60.
33. Salem D, Natto Z, Elangovan S, Karimbux N. Usage of Bone Replacement Grafts in Periodontics and Oral Implantology and Their Current Levels of Clinical Evidence - A Systematic Assessment. *J Periodontol*. 2016;87(8):872-9.
34. Y. F, J. J. Bone grafts and their substitutes. *The Bone & Joint Journal*. 2016;98-B(1_Supple_A):6-9.
35. Tetè S, Zara S, Vinci R, Zizzari V, Di Tore U, Mastrangelo F, et al. Vascular Endothelial Growth Factor and E-Nitric Oxide Synthase-Mediated Regenerative Response Occurring upon Autologous and Heterologous Bone Grafts. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2009;22(4):1105-16.
36. Tetè S, Mastrangelo F, Carone L, Nargi E, Costanzo G, Vinci R, et al. Morphostructural Analysis of Human Follicular Stem Cells on Highly Porous Bone Hydroxyapatite Scaffold. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2007;20(4):819-26.
37. Traini T, Degidi M, Sammons R, Stanley P, Piattelli A. Histologic and Elemental Microanalytical Study of Anorganic Bovine Bone Substitution Following Sinus Floor Augmentation in Humans. *Journal of Periodontology*. 2008;79(7):1232-40.
38. Artzi Z, Nemcovsky CE, Tal H, Dayan D. Histopathological morphometric evaluation of 2 different hydroxyapatite-bone derivatives in sinus augmentation procedures: a comparative study in humans. *J Periodontol*. 2001;72(7):911-20.

39. Cardoso CL, Curra C, Santos PL, Rodrigues MFM, Ferreira-Júnior O, de Carvalho PSP. Current considerations on bone substitutes in maxillary sinus lifting. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*. 2016;9(2):102-7.
40. Bracey D, Seyler T, Jinnah A, Lively M, Willey J, Smith T, et al. A Decellularized Porcine Xenograft-Derived Bone Scaffold for Clinical Use as a Bone Graft Substitute: A Critical Evaluation of Processing and Structure. *Journal of Functional Biomaterials*. 2018;9(3):45.
41. Calvo-Guirado JL, Gómez-Moreno G, Guardia J, Ortiz-Ruiz A, Piattelli A, Barone A, et al. Biological Response to Porcine Xenograft Implants: An Experimental Study in Rabbits. *Implant Dentistry*. 2012;21(2):112-7.
42. Feng W, Fu L, Liu J, Li D. The Expression and Distribution of Xenogeneic Targeted Antigens on Porcine Bone Tissue. *Transplantation Proceedings*. 2012;44(5):1419-22.
43. Orsini G, Scarano A, Piattelli M, Piccirilli M, Caputi S, Piattelli A. Histologic and Ultrastructural Analysis of Regenerated Bone in Maxillary Sinus Augmentation Using a Porcine Bone-Derived Biomaterial. *Journal of Periodontology*. 2006;77(12):1984-90.
44. Ramírez-Fernández MP, Calvo-Guirado JL, Maté-Sánchez del Val JE, Delgado-Ruiz RA, Negri B, Barona-Dorado C. Ultrastructural study by backscattered electron imaging and elemental microanalysis of bone-to-biomaterial interface and mineral degradation of porcine xenografts used in maxillary sinus floor elevation. *Clinical Oral Implants Research*. 2013;24(5):523-30.
45. Scarano A, Piattelli A, Perrotti V, Manzon L, Iezzi G. Maxillary Sinus Augmentation in Humans Using Cortical Porcine Bone: A Histological and Histomorphometrical Evaluation After 4 and 6 Months. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 2011;13(1):13-8.

46. Calvo-Guirado JL, Aguilar-Salvatierra A, Ramirez-Fernandez MP, Mate Sanchez de Val JE, Delgado-Ruiz RA, Gomez-Moreno G. Bone response to collagenized xenografts of porcine origin (mp3((R))) and a bovine bone mineral grafting (4BONE() XBM) grafts in tibia defects: experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27(8):1039-46.
47. Barone A, Ricci M, Covani U, Nannmark U, Azarmehr I, Calvo-Guirado JL. Maxillary Sinus Augmentation Using Prehydrated Corticocancellous Porcine Bone: Hystomorphometric Evaluation after 6 Months. *Clinical Implant Dentistry and Related Research.* 2012;14(3):373-9.
48. Mizuno M, Kuboki Y. Osteoblast-Related Gene Expression of Bone Marrow Cells during the Osteoblastic Differentiation Induced by Type I Collagen. *The Journal of Biochemistry.* 2001;129(1):133-8.
49. Nannmark U, Sennerby L. The Bone Tissue Responses to Prehydrated and Collagenated Cortico-Cancellous Porcine Bone Grafts: A Study in Rabbit Maxillary Defects. *Clinical Implant Dentistry and Related Research.* 2008;10(4):264-70.
50. Toker H, Ozdemir H, Ozer H, Eren K. Alendronate enhances osseous healing in a rat calvarial defect model. *Arch Oral Biol.* 2012;57(11):1545-50.
51. Pazianas M, Abrahamsen B. Safety of bisphosphonates. *Bone.* 2011;49(1):103-10.
52. Maruotti N, Corrado A, Neve A, Cantatore FP. Bisphosphonates: effects on osteoblast. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012;68(7):1013-8.
53. Russell RGG. Bisphosphonates: The first 40years. *Bone.* 2011;49(1):2-19.

54. Soares AP, do Espírito Santo RF, Line SRP, Pinto MdGF, Santos PdM, Toralles MBP, et al. Bisphosphonates: Pharmacokinetics, bioavailability, mechanisms of action, clinical applications in children, and effects on tooth development. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2016;42:212-7.
55. Xiong Y, Yang HJ, Feng J, Shi ZL, Wu LD. Effects of alendronate on the proliferation and osteogenic differentiation of MG-63 cells. *J Int Med Res*. 2009;37(2):407-16.
56. Reszka AA, Rodan GA. Nitrogen-containing bisphosphonate mechanism of action. *Mini Rev Med Chem*. 2004;4(7):711-9.
57. Ebetino FH, Hogan A-ML, Sun S, Tsoumpra MK, Duan X, Triffitt JT, et al. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. *Bone*. 2011;49(1):20-33.
58. Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Monkkonen J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone*. 2011;49(1):34-41.
59. Coxon FP, Thompson K, Roelofs AJ, Ebetino FH, Rogers MJ. Visualizing mineral binding and uptake of bisphosphonate by osteoclasts and non-resorbing cells. *Bone*. 2008;42(5):848-60.
60. D'Aoust P, McCulloch CA, Tenenbaum HC, Lekic PC. Etidronate (HEBP) promotes osteoblast differentiation and wound closure in rat calvaria. *Cell Tissue Res*. 2000;302(3):353-63.
61. Russell RGG. Bisphosphonates. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1068(1):367-401.

62. Baroncelli GI, Bertelloni S. The Use of Bisphosphonates in Pediatrics. *Hormone Research in Paediatrics*. 2014;82(5):290-302.

63. Mönkkönen H, Auriola S, Lehenkari P, Kellinsalmi M, Hassinen IE, Vepsäläinen J, et al. A new endogenous ATP analog (Apppl) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. *British Journal of Pharmacology*. 2006;147(4):437-45.

64. Bellido T, Plotkin LI. Novel actions of bisphosphonates in bone: preservation of osteoblast and osteocyte viability. *Bone*. 2011;49(1):50-5.

65. Idris AI, Rojas J, Greig IR, Van't Hof RJ, Ralston SH. Aminobisphosphonates cause osteoblast apoptosis and inhibit bone nodule formation in vitro. *Calcif Tissue Int*. 2008;82(3):191-201.

66. Ishtiaq S, Edwards S, Sankaralingam A, Evans BA, Elford C, Frost ML, et al. The effect of nitrogen containing bisphosphonates, zoledronate and alendronate, on the production of pro-angiogenic factors by osteoblastic cells. *Cytokine*. 2015;71(2):154-60.

67. Pan B, Farrugia AN, To LB, Findlay DM, Green J, Lynch K, et al. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Bone Miner Res*. 2004;19(1):147-54.

68. Pazianas M, van der Geest S, Miller P. Bisphosphonates and bone quality. *BoneKEy Reports*. 2014;3:529.

69. Fischer KR, Stavropoulos A, Calvo-Guirado JL, Schneider D, Fickl S. Influence of local administration of pamidronate on extraction socket healing--a histomorphometric proof-of-principle pre-clinical in vivo evaluation. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26(10):1135-42.

70. Lozano-Carrascal N, Delgado-Ruiz Ra, Gargallo-Albiol J, Maté-Sánchez JE, Hernandez Alfaro F, Calvo-Guirado JL. Xenografts Supplemented with Pamindronate placed in postextraction sockets to avoid crestal bone resorption. Experimental study in Fox hound dogs. *Clinical Oral Implants Research*. 2016;27(2):149-55.

71. Allen MR, Burr DB. Bisphosphonate effects on bone turnover, microdamage, and mechanical properties: What we think we know and what we know that we don't know. *Bone*. 2011;49(1):56-65.

72. Camati PR, Giovanini AF, de Miranda Peixoto HE, Schuanka CM, Giacomel MC, de Araújo MR, et al. Immunoexpression of IGF1, IGF2, and osteopontin in craniofacial bone repair associated with autogenous grafting in rat models treated with alendronate sodium. *Clinical Oral Investigations*. 2017;21(5):1895-903.

73. Vieira JdS, Giovanini A, Görhinger I, Gonzaga CC, Costa-Casagrande TA, Deliberador TM. Use of Low-Dose Alendronate Improves Cranial Bone Repair and Is Associated With an Increase of Osteocalcin: An Experimental Study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2017;75(9):1873-81.

74. Tanaka T, Saito M, Chazono M, Kumagae Y, Kikuchi T, Kitasato S, et al. Effects of alendronate on bone formation and osteoclastic resorption after implantation of beta-tricalcium phosphate. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2010;93A(2):469-74.

75. Altundal H, Gursoy B. The influence of alendronate on bone formation after autogenous free bone grafting in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;99(3):285-91.

76. Küçük D, Ay S, Kara MI, Avunduk MC, Gümüş C. Comparison of local and systemic alendronate on distraction osteogenesis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2011;40(12):1395-400.

77. Göhringer I, Muller CLS, Cunha EJ, Passoni GNDS, Vieira JS, Zielak JC, et al. Would Be Prophylactic Administrations of Low Concentration of Alendronate an Alternative for Improving the Craniofacial Bone Repair? A Preliminary Study Focused in the Period of Cellular Differentiation and Tissue Organization. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2017;28(7):1869-73.
78. Baas J, Vestermark M, Jensen T, Bechtold J, Soballe K, Jakobsen T. Topical bisphosphonate augments fixation of bone-grafted hydroxyapatite coated implants, BMP-2 causes resorption-based decrease in bone. *Bone*. 2017;97:76-82.
79. Mathijssen NMC, Buma P, Hannink G. Combining bisphosphonates with allograft bone for implant fixation. *Cell and Tissue Banking*. 2014;15(3):329-36.
80. Accorsi-Mendonça T, Zambuzzi WF, Bramante CM, Cestari TM, Taga R, Sader M, et al. Biological monitoring of a xenomaterial for grafting: an evaluation in critical-size calvarial defects. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2011;22(4):997-1004.
81. Massa LF, Bradaschia-Correa V, Arana-Chavez VE. Immunocytochemical study of amelogenin deposition during the early odontogenesis of molars in alendronate-treated newborn rats. *J Histochem Cytochem*. 2006;54(6):713-25.
82. Arana-Chavez VE, Nanci A. High-resolution immunocytochemistry of noncollagenous matrix proteins in rat mandibles processed with microwave irradiation. *J Histochem Cytochem*. 2001;49(9):1099-109.
83. Hoffmann O. Animal models of bone disease and repair. *Drug Discovery Today: Disease Models*. 2014;13:1-2.
84. von Rechenberg B. Animal models in bone repair. *Drug Discovery Today: Disease Models*. 2014;13:23-7.

85. Li Y, Chen S-K, Li L, Qin L, Wang X-L, Lai Y-X. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *Journal of Orthopaedic Translation*. 2015;3(3):95-104.
86. Peric M, Dunic-Cule I, Grcevic D, Matijasic M, Verbanac D, Paul R, et al. The rational use of animal models in the evaluation of novel bone regenerative therapies. *Bone*. 2015;70:73-86.
87. Maciel J, Momesso GAC, Ramalho-Ferreira G, Consolaro RB, Perri de Carvalho PS, Faverani LP, et al. Bone Healing Evaluation in Critical-Size Defects Treated With Xenogenous Bone Plus Porcine Collagen. *Implant Dentistry*. 2017;26(2):296-302.
88. Yaffe A, Kollerman R, Bahar H, Binderman I. The Influence of Alendronate on Bone Formation and Resorption in a Rat Ectopic Bone Development Model. *Journal of Periodontology*. 2003;74(1):44-50.
89. Figueiredo A, Coimbra P, Cabrita A, Guerra F, Figueiredo M. Comparison of a xenogeneic and an alloplastic material used in dental implants in terms of physico-chemical characteristics and in vivo inflammatory response. *Materials Science and Engineering: C*. 2013;33(6):3506-13.
90. Drake MC, M; Sundeep K. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc*. 2008;83:1032-45.
91. Kim J-H, Park Y-B, Li Z, Shim J-S, Moon H-S, Jung H-S, et al. Effect of alendronate on healing of extraction sockets and healing around implants. *Oral Diseases*. 2011;17(7):705-11.

92. Menezes AMA, Rocha FAC, Chaves HV, Carvalho CBM, Ribeiro RA, Brito GAC. Effect of Sodium Alendronate on Alveolar Bone Resorption in Experimental Periodontitis in Rats. *Journal of Periodontology*. 2005;76(11):1901-9.
93. Bradaschia-Correa V, Moreira MM, Arana-Chavez VE. Reduced RANKL expression impedes osteoclast activation and tooth eruption in alendronate-treated rats. *Cell and Tissue Research*. 2013;353(1):79-86.
94. Dundar S, Ozgur C, Yaman F, Cakmak O, Saybak A, Ozercan I, et al. Guided bone regeneration with local zoledronic acid and titanium barrier: An experimental study. *EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE*. 2016.
95. Abbaspour A, Takahashi M, Sairyo K, Takata S, Yukata K, Inui A, et al. Optimal increase in bone mass by continuous local infusion of alendronate during distraction osteogenesis in rabbits. *Bone*. 2009;44(5):917-23.
96. Moller B, Wiltfang J, Acil Y, Gierloff M, Lippross S, Terheyden H. Prevention of the surface resorption of bone grafts by topical application of bisphosphonate on different carrier materials. *Clin Oral Investig*. 2014;18(9):2203-11.
97. Jung A, Bisaz S, Fleisch H. The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals. *Calcified Tissue Research*. 1973;11(4):269-80.
98. Ozturk AM, Tabak AY, Aktekin CN, Altay M, Erdemli E, Karahuseyinoglu S, et al. Alendronate enhances antibiotic-impregnated bone grafts in the treatment of osteomyelitis. *International Orthopaedics*. 2008;32(6):821-7.
99. von Knoch F, Jaquiere C, Kowalsky M, Schaeren S, Alabre C, Martin I, et al. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials*. 2005;26(34):6941-9.

100. Graziani FD, MCD, PhD; Rosini, Stefano DDS; Cei, Silvia DDS, PhD; La Ferla, Fabio DDS; Gabriele, Mario MD, DDS. The Effects of Systemic Alendronate With or Without Intraalveolar Collagen Sponges on Postextractive Bone Resorption: A Single Masked Randomized Clinical Trial. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2008;19(4):1061-6.
101. Srisubut S, Teerakapong A, Vattraphodes T, Taweechaisupapong S. Effect of local delivery of alendronate on bone formation in bioactive glass grafting in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;104(4):e11-6.
102. Nishitani K, Shirai T, Kobayashi M, Kuroki H, Azuma Y, Nakagawa Y, et al. Positive Effect of Alendronate on Subchondral Bone Healing and Subsequent Cartilage Repair in a Rabbit Osteochondral Defect Model. *The American Journal of Sports Medicine*. 2009;37(1_suppl):139-47.
103. Turri A, Elgali I, Vazirisani F, Johansson A, Emanuelsson L, Dahlin C, et al. Guided bone regeneration is promoted by the molecular events in the membrane compartment. *Biomaterials*. 2016;84:167-83.
104. Killeen AC, Rakes PA, Schmid MJ, Zhang Y, Narayana N, Marx DB, et al. Impact of Local and Systemic Alendronate on Simvastatin-Induced New Bone Around Periodontal Defects. *Journal of Periodontology*. 2012;83(12):1463-71.
105. Hikita H, Miyazawa K, Tabuchi M, Kimura M, Goto S. Bisphosphonate administration prior to tooth extraction delays initial healing of the extraction socket in rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 2009;27(6):663-72.

ANEXO – Parecer da Comissão de Ética no uso de animais



Fundada em 1900

"Em constante busca da excelência"

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Tel. (11) 3091 7842
ceuafo@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo imuno-histoquímico do efeito local e sistêmica do alendronato sódico na reparação de defeitos preenchidos com xenoenxerto porcino no osso parietal de ratos.", registrada com o nº 011/2017, sob a responsabilidade de Victor Elias Arana-Chavez, Blanca Emperatriz Real López, Angel Eduardo Garrido Cisneros, Elisangela Chinen que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Odontologia da USP, em reunião de 08/05/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	08/05/2017 A 08/05/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogêneo / Wistar
Nº de animais	60
Peso/Idade	280g a 300g / 3 semanas
Sexo	Masculino
Origem	Biotério do ICB-USP

São Paulo, 10 de maio de 2017.

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
Coordenador do CEUA-FOUSP

Handwritten note in blue ink:
Arabi em
10/05/2017
Cai
M.