

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

NATÁLIA MARRECO WEIGERT

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

Vitória
2016

NATÁLIA MARRECO WEIGERT

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Nascimento Silva

Vitória

2016

NATÁLIA MARRECO WEIGERT

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica.

Aprovado em 08 de julho de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Daniela Nascimento Silva
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Profa. Dra. Liliane Scheidegger da Silva Zanetti
Faculdades Integradas Espírito-Santenses

Prof. Dr. Sérgio Lins de Azevedo Vaz
Universidade Federal do Espírito Santo

Dedico este trabalho aos meus pais, meus exemplos de vida, pelo incentivo e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por dar-me força e determinação nesta conquista.

Aos meus pais, pelo apoio e incentivo para vencer mais esta etapa.

Aos meus irmãos, pelo carinho e pela torcida.

Ao Leandro, pela compreensão, suporte e amor a todo momento demonstrados.

A minha orientadora, Profa. Dra. Daniela Nascimento Silva, por toda ajuda, pela disponibilidade integral, pelos ensinamentos transmitidos e oportunidades dadas.

À coordenadora do biotério, Dra. Livia Carla de Melo Rodrigues, à Profa. Ana Paula Santana de Vasconcellos Bittencourt, ao responsável técnico Rodolfo, ao parceiro de pesquisa Douglas Musso e aos funcionários João Batista e Dora por serem sempre solícitos para o prosseguimento e conclusão do trabalho.

Ao Prof. Sacha Braun e à Profa. Karla Rovaris, pela disponibilidade e grande contribuição.

À coordenadora do curso de pós-graduação em Clínica Odontológica da UFES, Dra. Selva Maria Gonçalves Guerra, por sempre se preocupar com a melhora e bom andamento do curso.

A todos os demais professores do curso pós-graduação em Clínica Odontológica da UFES que, sem dúvida, contribuíram para a minha formação como Mestre e que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

À Paula Ballista e Patrícia Zambon pela amizade construída nessa trajetória e fortalecida pelas peculiaridades dos acontecimentos ao longo do curso. Agradeço também aos demais colegas do mestrado, pelos momentos de alegria e aprendizado.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro.

RESUMO

Introdução: O alendronato de sódio (ALN) tem demonstrado um efeito anabólico no reparo ósseo quando associado aos enxertos provenientes de osso bovino liofilizado, porém a forma de administração e a concentração ainda são objetos de investigação. **Objetivo:** Esta pesquisa avaliou os efeitos do uso tópico do ALN a 0,5% isolado ou em associação ao Bio-Oss[®] sobre o reparo ósseo dos defeitos confeccionados em calvária de ratos, por meio de imagens microtomográficas. **Metodologia:** Duas cavidades (direita e esquerda) de 5mm de diâmetro foram confeccionadas na calvária de 18 ratos Wistar, totalizando 36 defeitos ósseos, preenchidos de acordo com cada grupo (n=9): grupo A (GA) = ALN 0,5% veiculado em esponja de gelatina; grupo B (GB) = Bio-Oss[®]; grupo AB (GAB) = Bio-Oss[®] embebido em ALN 0,5%; grupo controle (GC) = coágulo sanguíneo. Os animais foram eutanasiados aos 90 dias de pós-operatório. Os espécimes foram submetidos ao escaneamento por meio da microtomografia computadorizada (micro-CT), sendo analisados os parâmetros tridimensionais de qualidade (volume tecidual total, densidade volumétrica e volume ósseo) e microarquitetura óssea (número de trabéculas ósseas, espessura trabecular e espaço entre as trabéculas ósseas). Para comparação entre os grupos, foi aplicado o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). **Resultados:** O GB apresentou volume ósseo ($12,74 \pm 1,77 \text{ mm}^3$) estatisticamente maior que o GC ($8,99 \pm 2,58 \text{ mm}^3$; $p=0,016$). O GAB apresentou número de trabéculas ósseas ($0,97 \pm 0,28 \text{ mm}^{-1}$), significativamente maior que os grupos GA e GC ($0,64 \pm 0,14 \text{ mm}^{-1}$ e $0,65 \pm 0,14 \text{ mm}^{-1}$, respectivamente; $p=0,03$). O GA mostrou-se com maior espessura trabecular ($0,58 \pm 0,09 \text{ mm}$) e estatisticamente diferente do GAB ($0,45 \pm 0,08 \text{ mm}$; $p=0,017$). Não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao volume tecidual total, densidade volumétrica do osso e espaçamento entre as trabéculas ósseas. **Conclusão:** O ALN 0,5% isoladamente promoveu trabéculas ósseas em menor número, porém mais espessas do que quando associada ao Bio-Oss[®]. A adição do ALN 0,5% ao Bio-Oss[®] não alterou o espaçamento entre as trabéculas e os parâmetros de qualidade óssea obtidos pela micro-CT.

Descritores^a: Osso; Alendronato; Substitutos Ósseos; Microtomografia por Raio-X; Rato.

^a DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. Disponível em <http://decs.bvs.br/>

ABSTRACT

Introduction: Sodium alendronate (ALN) have demonstrated an anabolic effect on bone healing when associated with grafts from lyophilized bovine bone, but the administration procedures and concentration are still under investigation. **Objective:** This study evaluated the effects of topical use of 0.5% ALN, isolated or in association with Bio-Oss[®], in repair of rat calvaria bone defects, through micro tomographic images (micro-CT). **Methodology:** Two 5 mm diameter cavities (right and left) were made on 18 Wistar rat's skulls, totaling 36 bone defects filled according to each group (n = 9): Group A (GA) = 0.5% ALN placed with gelatin sponge; group B (GB) = Bio-Oss[®]; group AB (GAB) = Bio-Oss[®] blended 0.5% ALN; control group (CG) = blood clot. The animals were euthanized at 90 days postoperatively. The specimens were subjected to scanning by micro-CT. The three-dimensional quality parameters (total tissue volume, volume density and bone volume) and bone microarchitecture (number of trabecular bone, trabecular thickness and space between trabecular bone) were analyzed. To compare the groups, the Tukey test was applied ($p \leq 0.05$). **Results:** The GB group showed statistically higher bone volume ($12.74 \pm 1.77 \text{ mm}^3$) than the control group ($8.99 \pm 2.58 \text{ mm}^3$; $p = 0.016$). GAB group presented significantly higher number of bone trabeculae ($0.97 \pm 0.28 \text{ mm}^{-1}$) than GA and GC groups ($0.64 \pm 0.14 \text{ mm}^{-1}$ and $0.65 \pm 0.14 \text{ mm}^{-1}$, respectively; $p = 0.03$). GA group shown more trabecular thickness ($0.58 \pm 0.09 \text{ mm}$) and statistically different than GAB group ($0.45 \pm 0.08 \text{ mm}$; $p = 0.017$). There was no significant difference between the groups regarding the total tissue volume, volumetric bone density and the spacing of the trabecular bone. **Conclusion:** 0.5% ALN isolated promoted fewer trabecular bone, but them were thicker when associated with Bio-Oss[®]. Add 0.5% ALN in Bio-Oss[®] did not modify the spacing between the bone trabeculae and the quality parameters obtained by micro-CT.

Descriptors^a: Bone; Alendronate; Bone Replacement Materials; X-Ray Microtomography; Rat.

^a DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. Disponível em <http://decs.bvs.br/>
MESH - Medical Subject Headings. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura química dos BFs em comparação com a do pirofosfato.....	19
FIGURA 2 - A) O BF se liga à parte mineral do tecido ósseo e é liberado durante o processo de reabsorção óssea, sendo absorvido pelos osteoclastos. B) Os osteoclastos sofrem alterações, como a perda de prolongamentos vilosos, tornando-se inativos. C) Os osteoclastos perdem a sua capacidade de digestão do osso e entram em apoptose, ocorrendo uma redução do processo de reabsorção óssea, enquanto que a lacuna de reabsorção é preenchida por osso novo.....	22
FIGURA 3 - Mecanismo de ação molecular dos BFs.....	23
FIGURA 4 - Cloridrato de Ketamina (Ketamina Agener [®]) e Cloridrato de Xilazina (Anasedan [®]) utilizados para anestesia geral e Enrofloxacino (Flotril [®]) para profilaxia antibiótica.....	35
FIGURA 5 - A) Incisão dermoperiosteal entre os pavilhões auriculares após tricotomia. B) Descolamento do periósteo e exposição da calvária.....	36
FIGURA 6 - Representação esquemática da calvária do rato. Defeitos ósseos de 5mm de diâmetro (d) (cavidades direita esquerda), confeccionados nos ossos parietais.....	36
FIGURA 7 - A) Confeção das cavidades ósseas utilizando broca multilaminada em forma de pêra, em baixa rotação, sob irrigação com soro fisiológico. B) Cavidades ósseas direita e esquerda confeccionadas de cada lado da sutura sagital mediana.....	37
FIGURA 8 - A) Solução de ALN 0,5%; B) Esponja de gelatina reabsorvível, utilizada como veículo para inserção e manutenção do ALN na cavidade óssea; C) Disco de esponja de gelatina de 5mm embebido na solução de ALN.....	38
FIGURA 9 - A) Ilustração dos grânulos de Bio-Oss [®] 0.25-1.0mm e B) Embalagem com especificações do enxerto ósseo bovino.....	38

FIGURA 10 - A) Cavidade óssea direita preenchida com grânulos de Bio-Oss® e cavidade esquerda sem material (coágulo sanguíneo). B) Sutura com pontos isolados utilizando fio nylon 5-0.....	39
FIGURA 11 - Microtomógrafo Skyscan 1072 (Kontich, Bélgica).....	40
FIGURA 12 - Reposicionamento das imagens com cortes atravessando o defeito no seu longo eixo, por meio do <i>software</i> DataViewer. Demonstração do lado esquerdo da calvária (Grupo AB).....	42
FIGURA 13 - A) Seleção da região de interesse feita em uma reconstrução axial após alinhamento da imagem pelo <i>software</i> CTAnalyser (Bruker, Kontich, Bélgica). Circunferência de 5mm de diâmetro posicionada na imagem de acordo com o centro do defeito. B) Seleção do defeito.....	42
FIGURA 14 - Imagem tomográfica da área de interesse: osso neoformado selecionado em vermelho e grânulos de Bio-Oss® excluídos em verde.	43

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 - BFs e suas respectivas potências antirreabsortivas relativas em modelos <i>in vivo</i>	20
QUADRO 2 - Distribuição dos grupos de acordo com o tratamento instituído.....	34
QUADRO 3 - Parâmetros obtidos pela micro-CT relacionados à qualidade e microarquitetura óssea.....	44
TABELA 1 - Caracterização dos parâmetros de qualidade óssea obtidas pela micro-CT, em cada grupo.....	45
TABELA 2 - Caracterização dos parâmetros de microarquitetura óssea obtidas em cada grupo.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
PPGCO	Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica
ALN	Alendronato
®	Marca registrada
%	Porcento
GA	Grupo Alendronato
GB	Grupo Bio-Oss®
GAB	Grupo Alendronato + Bio-Oss®
GC	Grupo Controle
BF	Bifosfonato
BFs	Bifosfonatos
mm	Milímetro (s)
micro-CT	Microtomografia computadorizada
3D	Tridimensional
µm	Micrometro (s)
m ² /g	Metro quadrado por grama
Enzima farnesil-pirofosfato sintase	FPP sintase
Trifosfato de guanossina	GTP
mg	Miligramma (s)
g/L	Gramma (s) por litro
mg/mL	Miligramma (s) por mililitro
mg/Kg	Miligramma (s) por quilogramma
µL	Microlitro (s)
µCi/mg	Microcuries por miligramma
mL	Mililitro (s)
mM	Milimolar
rhBMP-2	Proteína óssea morfogenética

RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i> - ligante do receptor do fator nuclear kappa-B
mm ³	Milímetro cúbico
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CCS	Centro de Ciências da Saúde
COBEA	Conselho Brasileiro de Experimentação Animal
g	Gramma (s)
°C	Grau (s) celsius
h	Hora (s)
cm	Centímetro (s)
TNT	Tecido não tecido
L	Litro (s)
mg/L	Miligra (s) por litro
kV:	Quilovolt
µA	Microampère
ms	Milissegundo (s)
°	Grau (s)
mm ²	Milímetro quadrado
VT	Volume tecidual total
VO	Volume do osso
VO/VT	Densidade volumétrica do osso
TB.TH	Espessura trabecular
TB.SP	Espaços entre as trabéculas ósseas
TB.N	Número de trabéculas ósseas
M	Média
DP	Desvio-padrão
p	Probabilidade de erro
TCCB	Tomografia computadorizada <i>cone beam</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 OSSO BOVINO LIOFILIZADO	18
2.2 BIFOSFONATOS	19
2.2.1 Alendronato de Sódio	24
2.2.1.1 Uso tópico do alendronato no tecido ósseo	25
2.3 ASSOCIAÇÃO OSSO BOVINO LIOFILIZADO (BIO-OSS®) + BIFOSFONATOS	26
2.4 MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA	28
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	33
4.2 DELINEAMENTO DA PESQUISA	33
4.3 AMOSTRA E DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS	34
4.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	34
4.5 MORTE DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS PEÇAS OPERATÓRIAS	39
4.6 ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA COMPUTADORIZADA	40
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5 RESULTADOS	45
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÕES	55

REFERÊNCIAS _____	56
ANEXOS _____	65
<i>ANEXO A - Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFES - Protocolo nº 10/2014</i> _____	65
<i>ANEXO B - MANIPULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE ALENDRONATO DE SÓDIO 1,6mg/L</i> _____	66

1 INTRODUÇÃO

O uso do enxerto ósseo para promover a regeneração óssea tornou-se um procedimento cirúrgico maxilofacial de rotina, especialmente quando os mecanismos regenerativos endógenos são insuficientes, como nos grandes defeitos ósseos. O enxerto autógeno é considerado padrão-ouro quanto ao reparo ósseo devido às suas propriedades osteogênicas, seguido dos aloenxertos, ambos osteocondutores e osteoindutores. No entanto, desvantagens como maior morbidade e alto índice de reabsorção, representam limitações do seu uso (BRYDONE; MEEK; MACLAINE, 2010), o que estimula a busca em desenvolver ou aprimorar biomateriais sintéticos ou naturais de substituição óssea (ELGALI et al., 2014).

Os biomateriais são definidos como uma substância ou combinação de substâncias, farmacologicamente inertes, de natureza sintética ou natural, que são utilizados para melhorar, aumentar ou substituir parcial ou integralmente tecidos e órgãos. Dentre os biomateriais, encontram-se os xenoenxertos, cuja origem do tecido do doador e do receptor são de espécies diferentes. Os xenoenxertos de origem bovina tem excelentes propriedades de osteocondução e apresentam baixo índice de reabsorção (TRAINI et al., 2007). Possuem resistência biomecânica similar à do osso humano e tratamentos adequados para a sua obtenção podem evitar respostas imunológicas ou inflamatórias adversas (PETTINICCHIO et al., 2012).

No intuito de melhorar a quantidade e a qualidade do osso a ser regenerado, tem sido associado aos enxertos o uso dos mediadores biológicos (WOZNEY, 1992). Mediadores do metabolismo ósseo, conhecidos como bifosfonato (BF), são medicamentos eficazes utilizados para tratar doenças ósseas relacionadas à reabsorção óssea excessiva, como a osteoporose, doença de Paget, hipercalcemia e neoplasias ósseas malignas ou metástases ósseas (LI et al., 2014).

O primeiro relato encontrado na literatura sobre a associação do osso bovino com um BF foi realizado por Houshmand et al. (2007). Os autores avaliaram o uso do pamidronato de sódio associado ao enxerto ósseo bovino liofilizado (Bio-Oss®) em defeitos criados em mandíbulas de ovelhas, e observaram maior neoformação óssea, além de menor número de osteoclastos no local.

Acredita-se que esses fármacos modifiquem o processo de remodelação óssea por meio da sua ação direta sobre os osteoclastos ou por meio de fatores liberados pelos osteoblastos, que inibem, por sua vez, a função osteoclástica (TENENBAUM et al., 2002). Baseado nesse duplo mecanismo de ação, o uso dos BFs associados aos enxertos ósseos durante procedimentos de regeneração óssea tem sido objeto de investigação (SEO et al., 2010).

Os BFs podem ser nitrogenados ou não-nitrogenados. Os que contêm nitrogênio tem maior potência para inibir a reabsorção óssea. O alendronato de sódio (ALN) é um BF nitrogenado e apresenta aproximadamente 70 vezes mais atividade sobre os osteoclastos do que os BFs não-nitrogenados (MENEZES et al., 2005; COXON et al., 2006).

Alguns estudos defendem o uso da aplicação tópica do ALN em cirurgias ósseas para evitar a reabsorção óssea local e melhorar a neoformação óssea (YAFFE et al., 1999; TOKER et al., 2012), pois acreditam que uma única dose do ALN aplicada localmente permite uma adequada distribuição do medicamento no osso, devido à alta afinidade do BF à parte mineral deste tecido (YAFFE et al., 1999; SRISUBUT et al., 2007). No entanto, poucos estudos analisaram a associação do BF aos enxertos ósseos de origem bovina no processo de reparo ósseo, ora com resultados positivos (HOUSHMAND et al., 2007; ROCHA, 2013), ora negativos (MÖLLER et al., 2014). É unânime que o efeito do ALN sobre a neoformação ou reabsorção óssea é dose dependente (MÖLLER et al., 2014; KIM et al., 2015), porém a dosagem ideal ainda não está bem estabelecida.

A microtomografia computadorizada (*micro-computed tomography* - micro-CT) foi validada como um método de avaliação e análise 3D do osso trabecular em 1998, após a comparação dos seus resultados com os resultados morfométricos obtidos pela histomorfometria convencional (MÜLLER et al., 1998). As imagens obtidas pela micro-CT retratam a rede trabecular em diferentes níveis de cinza, de acordo com seu conteúdo mineral (GENANT; JIANG, 2006; LESPESSAILLES et al., 2006).

A partir destes pressupostos, o presente estudo propõe-se a avaliar os parâmetros de qualidade e microarquitetura óssea de defeitos confeccionados em calvária de ratos,

após a aplicação do ALN a 0,5% isoladamente ou em associação com osso bovino liofilizado (Bio-Oss[®]), através da análise microtomográfica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OSSO BOVINO LIOFILIZADO

O osso bovino liofilizado é um xenoenxerto produzido a partir do osso bovino cortical ou medular. Já existem estudos que demonstraram a ausência de proteína no biomaterial, tornando-o seguro para a utilização em humanos (BENKE; OLAH; MÖHLER, 2001). Além disso, são produzidos com propriedades potencialmente similares às do tecido receptor, e quando utilizados nos defeitos ósseos constituem um obstáculo à invasão do tecido mole adjacente (ELGALI et al., 2014). Possui disponibilidade praticamente ilimitada, além de grande similaridade físico-química e estrutural com o osso humano (GALIA et al., 2011).

Os biomateriais representam uma alternativa atrativa ao enxerto autógeno, uma vez que eles estão disponíveis em diversos tamanhos e formas, orgânicos ou inorgânicos, corticais ou esponjosos, em macro ou micropartículas, em blocos ou particulados e ainda podem ser modificados a fim de atuar como transportadores de matriz para a entrega de medicamentos, hormônios, fatores de crescimento e células-tronco (DA CRUZ et al., 2007; PETTINICCHIO et al., 2012).

O Bio-Oss® (Geistlich Pharma, Wolhusen, Suíça) é um biomaterial derivado do osso bovino, com 75% a 80% de porosidade. É formado principalmente por hidroxiapatita natural, assim como o tecido ósseo. A hidroxiapatita está na parte mineral do osso e é composta por uma fração de cálcio de aproximadamente 39,9% e fósforo 18,5% (MCDOWELL; GREGORY; BROWN, 1977). O Bio-Oss® tem mostrado excelentes propriedades de osteocondução e resultados promissores em procedimentos de elevação do assoalho do seio maxilar (WALLACE; FROUM; TARNOW, 1996), além de apresentar baixo índice de reabsorção (TRAINI et al., 2007).

Este material é utilizado principalmente para preencher falhas ósseas em cirurgias periodontais e maxilomandibulares. O preenchimento do defeito ósseo dá suporte para a normalização morfológica de uma área óssea traumatizada ou reabsorvida (SCHLEGEL; DONATH, 1998). A sua estrutura altamente porosa e sua arquitetura trabecular (tamanho de poro 300-1500 µm) oferecem espaço para a invasão de vasos sanguíneos e células ósseas, induzindo a formação de osso novo e correção do defeito (BOYNE, 1997).

Em consequência da sua grande área de superfície interna ($97\text{m}^2/\text{g}$), o Bio-Oss[®] atua como um arcabouço, guiando a formação do osso novo. Ele auxilia no crescimento de osteoblastos e se torna parte integrante do osso novo em formação. Essas células formam uma camada sobre a malha de Bio-Oss[®] e osteóide e, posteriormente, o osso lamelar o abrange, engrossando a estrutura do arcabouço (BOYNE, 1997). Na presença do Bio-Oss[®], os osteoblastos exibem uma alta atividade celular, como adesão, proliferação, diferenciação e formação de matriz calcificada (GALGUT; WAITE; TINKLER, 1990).

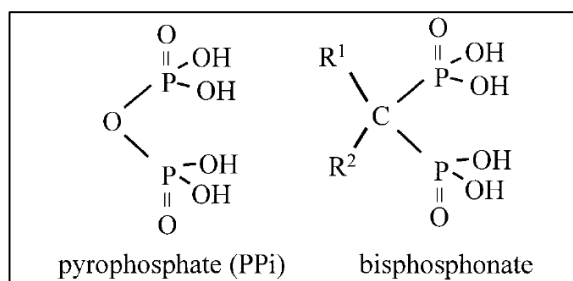
Devido à sua grande semelhança com o osso humano, o Bio-Oss[®] é incorporado no processo natural de modelagem e remodelação óssea, e ainda permanece por algum tempo, o que permite a correção dos defeitos alveolares de forma permanente. O Bio-Oss[®], quando integrado, ajuda a recriar o contorno ideal do rebordo alveolar, possibilitando a posterior reabilitação com implantes (SCHLEGEL; DONATH, 1998).

2.2 BIFOSFONATOS

Os BFs foram sintetizados pela primeira vez em 1800, mas somente nos últimos 40 anos passaram a ser utilizados no tratamento de doenças relacionadas a alterações do metabolismo do cálcio (RUSSEL, 2011).

Os BFs são análogos químicos do pirofosfato, um inibidor natural da reabsorção óssea, onde o átomo central de oxigênio é substituído por um de carbono. (FERNANDES; LEITE; LANÇAS, 2005) (FIGURA 1).

FIGURA 1 - Estrutura química dos BFs em comparação com a do pirofosfato.



Fonte: Rogers et al. (2000).

A estrutura P-C-P dos BFs é altamente resistente à hidrólise sob condições ácidas ou a pirofosfatases. Os dois grupos ligados covalentemente (cadeias laterais) unidos ao carbono central são geralmente referidos como R¹ e R². A primeira cadeia (R¹) é responsável pelas propriedades químicas e farmacocinéticas dos BFs, além de conferir, em conjunto com os grupamentos fosfato, alta afinidade ao tecido ósseo, permitindo que se liguem com eficácia e rapidez ao osso. Esta alta afinidade pelo tecido ósseo permite que as concentrações de BFs atinjam altos níveis em todo o esqueleto ósseo (ROGERS et al., 2000). Já a cadeia longa R², determina a potência antirreabsortiva e o mecanismo de ação farmacológico, ou seja, vai definir a atividade biológica nos osteoclastos, as células-alvo (CREMERS; PAPAPOULOS, 2011).

Há dois tipos de BFs: os que não contêm nitrogênio e os que contêm o nitrogênio na sua cadeia R², tendo como principal diferença a sua eficácia/potência antirreabsortiva (DRAKE; CLARKE; KHOSLA, 2008). Os BFs não-nitrogenados são denominados de primeira geração (etidronato, clodronato e tiludronato). Estes compostos atuam de forma semelhante à do pirofosfato: incorporam-se nas moléculas recém-formadas de adenosina trifosfato (ATP) presentes na superfície óssea, sendo depois captados pelos osteoclastos. Estes análogos de ATP são citotóxicos, sendo os responsáveis pela inibição da atividade osteoclástica. Os BFs nitrogenados são mais novos e potentes, e também denominados de segunda e terceira geração. A segunda geração compreende os amino-BFs, como o alendronato e o pamidronato, e a terceira geração possui uma cadeia cíclica, sendo seus representantes o risedronato e o zoledronato (FERNANDES; LEITE; LANÇAS, 2005; RUSSEL et al., 2008) (QUADRO 1).

QUADRO 1 - BFs e suas respectivas potências antirreabsortivas em modelos *in vivo*.

Bisfosfonato	R1	R2	Potência
Clodronato	Cl	Cl	~10
Etidronato	OH	CH ₃	~1
Pamidronato	OH	(CH ₂) ₂ NH ₂	~100
Alendronato	OH	(CH ₂) ₃ NH ₂	>100-<1000
Neridronato	OH	(CH ₂) ₅ NH ₂	~100
Olpadronato	OH	(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	>100-<1000
Ibandronato	OH	(CH ₂) ₂ N(CH ₃)(CH ₂) ₄ CH ₃	>1000-<10000
Risedronato	OH	CH ₂ -3-piridina	>1000-<10000
Zoledronato	OH	CH ₂ -imidazol	>10000

Fonte: Fernandes, Leite e Lanças (2005).

A potência e afinidade química dos BFs pelo tecido ósseo são o que determinam o seu efeito na inibição da reabsorção óssea, o que varia muito de composto para composto. Os BFs de segunda e terceira geração foram sintetizados com o objetivo principal de otimizar o efeito antirreabsortivo, sendo os mais potentes aqueles que contêm o átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico, como o risedronato e zoledronato, podendo ser até 10.000 vezes mais potentes que o etidronato *in vitro* (RUSSEL et al., 2008), de modo que as doses utilizadas clinicamente também irão variar (KANIS et al., 2008).

Os primeiros estudos com os BFs demonstraram que eles tem vários efeitos sobre a hidroxiapatita. Eles inibem a precipitação de fosfato de cálcio, retardam a transformação da hidroxiapatita amorfa em cristalina, inibem a agregação dos cristais, além de inibir a dissolução do cristal (TERKELTAUB, 2001).

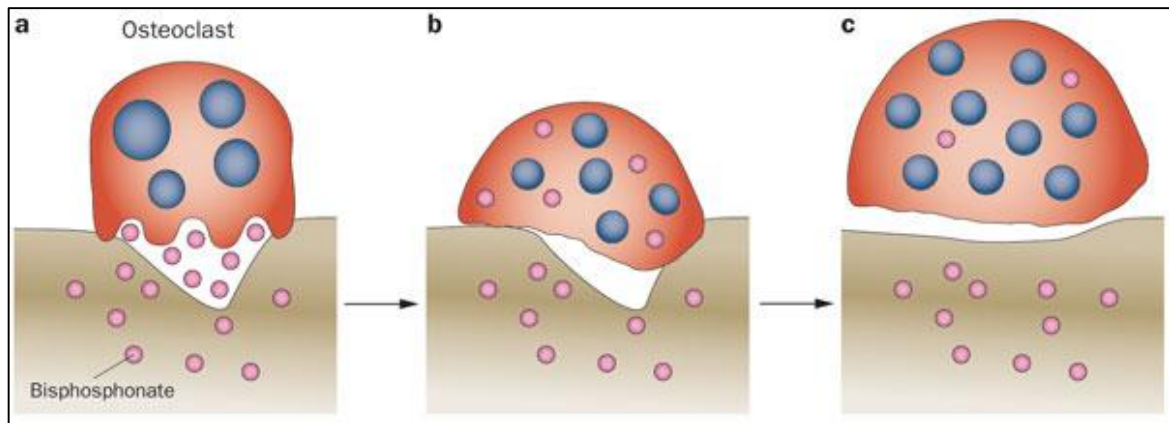
O mecanismo molecular pelo qual os BFs inibem a reabsorção óssea ainda não é completamente entendido. Inicialmente, acreditava-se que apenas um mecanismo físico-químico após sua adsorção óssea era suficiente para sua ação. No entanto, tem se tornado claro que efeitos celulares também estão envolvidos (FERNANDES; LEITE; LANÇAS, 2005).

O direcionamento específico dos BFs para os locais com atividade osteoclástica sugere que eles inibam a reabsorção óssea pelos seus efeitos diretos nos osteoclastos ou sobre outras células ósseas presentes no microambiente dos osteoclastos. A capacidade dos osteoclastos de internalizar os BFs em vacúolos de endocitose aponta que o mecanismo de ação possa ser intracelular. Após a entrada dos BFs nos osteoclastos, surge uma característica morfológica nestas células: observa-se a ausência da membrana plasmática com prolongamentos vilosos semelhante a uma borda estriada ou em escova. Esta zona irregular na superfície dos osteoclastos é essencial para liberar elementos provenientes da fermentação láctea, responsável pela dissolução dos cristais de hidroxiapatita presentes no tecido ósseo. Quando esta borda encontra-se comprometida, o osteoclasto perde a sua capacidade de digestão do osso e entra em apoptose, ocorrendo uma redução do processo de reabsorção óssea (ROGERS et al., 2000) (FIGURA 2).

De acordo com Enjuanes et al. (2010), os BFs estimulam a proliferação e maturação de osteoblastos e inibem sua apoptose. Estas observações suportam fortemente a

sugestão de que esses fármacos apresentem um efeito anabólico nos osteoblastos, promovendo, posteriormente, a formação óssea. Por conseguinte, as suas células-alvo podem incluir também células da linhagem osteoblástica.

FIGURA 2 – A) O BF se liga à parte mineral do tecido ósseo e é liberado durante o processo de reabsorção óssea, sendo absorvido pelos osteoclastos. **B)** Os osteoclastos sofrem alterações, como a perda de prolongamentos vilosos, tornando-se inativos. **C)** Os osteoclastos perdem a sua capacidade de digestão do osso e entram em apoptose, ocorrendo uma redução do processo de reabsorção óssea, enquanto que a lacuna de reabsorção é preenchida por osso novo.



Fonte: Papapoulos (2013).

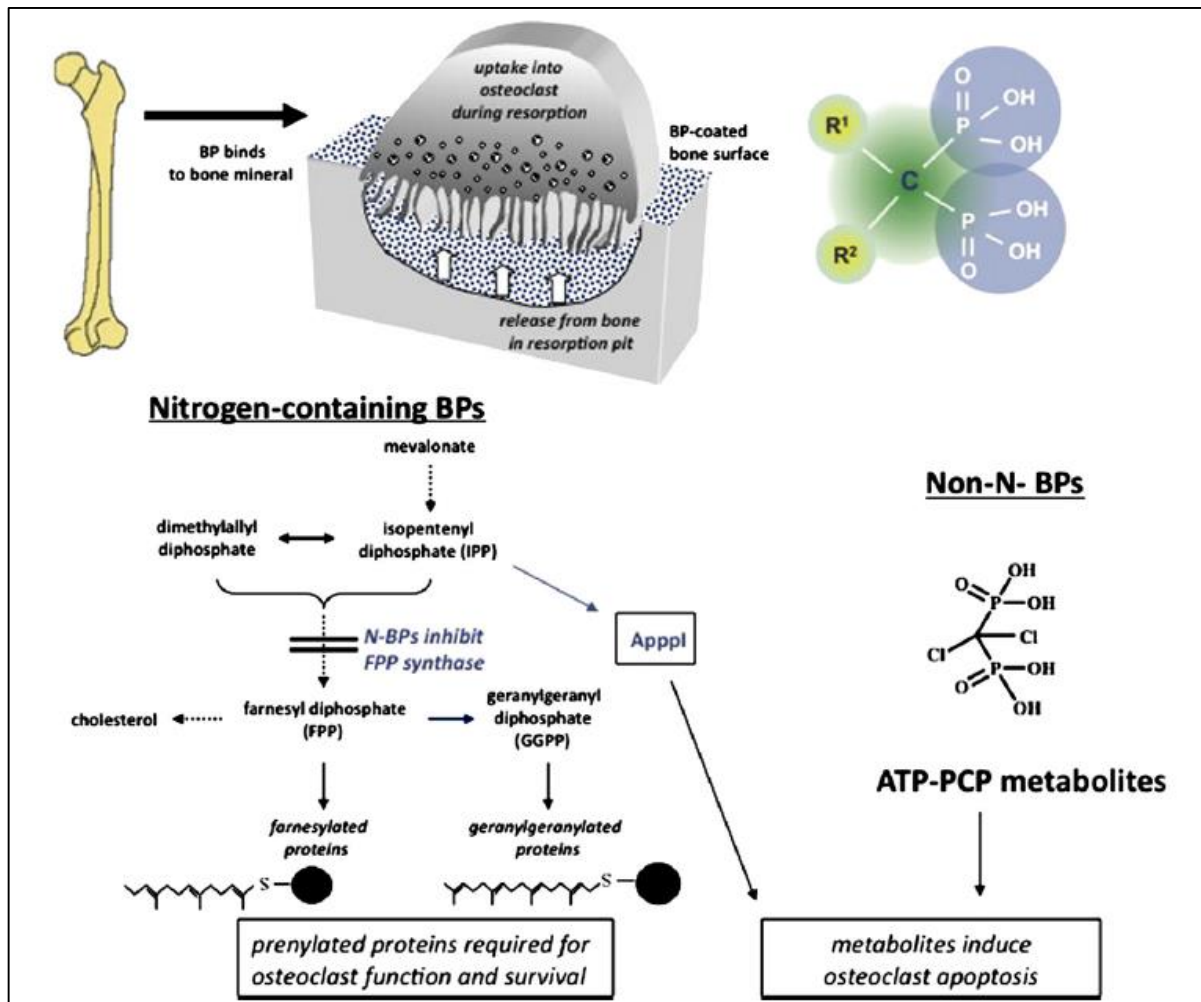
Após a internalização dos BFs nos osteoclastos durante o processo de reabsorção óssea por endocitose, os BFs não nitrogenados são metabolizados intracelularmente em metileno, substância análoga ao ATP. Esse metabólito acumula no citosol dos osteoclastos, induzindo-o à apoptose. Já os BFs nitrogenados promovem alterações em diversas propriedades e processos estruturais importantes na função osteoclástica. Eles atuam inibindo a enzima farnesil-pirofosfato sintase (FPP sintase), que é a chave na regulação da via do mevalonato^a, modificando a prenilação^b das proteínas ligadas ao trifosfato de guanosina (GTP), essenciais para o tráfego de vesículas e manutenção da integridade do citoesqueleto (FERNANDES; LEITE; LANÇAS, 2005; KANIS et al., 2008). Os BFs nitrogenados heterocíclicos, além de

^a Santos, Silva (2010): A via do mevalonato é uma via metabólica, na qual o mevalonato é o precursor de todos os isoprenóides (grandes cadeias hidrocarbonadas, apolares, assim como os lipídios) e esteróides dos organismos vivos. Além do colesterol, esta via produz isoprenóides intermediários, como a FPP e a GTP, que estão envolvidos na sinalização e proliferação celular.

^b www.lookformedical.com: A prenilação é a ligação de isoprenóides (FPP e GTP) a outros compostos, especialmente às proteínas. A porção lipídica (isoprenóides) se insere no interior da bicamada lipídica e a porção proteica se conserva na superfície da membrana. Esse processo é importante para manutenção das membranas celulares.

inibir a enzima FPP sintase, promovem também mudanças conformacionais que ampliam sua potência (RUSSEL et al., 2008; RUSSEL, 2011) (FIGURA 3).

FIGURA 3 – Mecanismo de ação molecular dos BFs.



Fonte: Russel (2011).

Os BFs são rapidamente depurados do plasma e cerca de 50% é depositado no osso, sendo o restante excretado na urina. Ligam-se preferencialmente em ossos com alta taxa de remodelação devido à grande exposição da hidroxiapatita nesses sítios. A sua meia-vida no osso é muito prolongada (KHAN et al., 1997).

Os BFs podem ter efeitos muito duradouros na redução da remodelação óssea, que parecem ser maior e mais prolongados em alguns grupos (por exemplo, alendronato e zoledronato) em comparação com os outros (etidronato e risedronato). Estas diferenças de retenção e persistência do efeito observado em estudos animais e

clínicos podem estar relacionadas com as diferenças observadas nas ligações entre o BF e a hidroxiapatita. Na tentativa de explicar a sua longa duração, tem sido proposto que existe uma contínua reciclagem dos BFs, que penetram e saem das superfícies ósseas (RUSSEL, 2000).

Acredita-se que o BF incorporado ao osso é liberado apenas durante a reabsorção óssea subsequente, explicando o porquê da sua lenta e demorada eliminação do esqueleto. A ligação preferencial, mas não exclusiva, do BFs para os locais com remodelação óssea ativa, a liberação dos BFs de superfície por dessorção^a, a sua incorporação no osso e o longo prazo para ocorrer a reabsorção subsequente, são utilizados para explicar as várias fases da eliminação do BF do osso (KHAN et al., 1997).

2.2.1 Alendronato de Sódio

O alendronato de sódio (ALN), fármaco cujo nome químico é 4-amino-1-hidroxi-butano bifosfonato de sódio, é um composto derivado do ácido alendrônico que apresenta uma potente capacidade de inibição da reabsorção óssea: 6 a 10 vezes mais potentes do que o pamidronato, e até 1.000 vezes mais potente do que o etidronato (MERAW; REEVE; WOLLAN, 1999). O ALN encontra-se frequentemente na forma triidratada (C₄H₁₂NNaO₇P₂.3H₂O). É constituído por um pó fino e branco, apresenta comportamento anfótero, visto que a sua estrutura possui característica ácida (dois grupos fosfóricos) e básica (grupo amina).

Por ser um BF nitrogenado, o ALN apresenta como mecanismo de ação a inibição da enzima FPP sintase. Como consequência, a prenilação de proteínas reguladoras intracelulares é prejudicada, ocorrendo a inibição do recrutamento ou diferenciação de osteoclastos, indução da apoptose ou morte celular (MCCLUNG, 2003).

O ALN é o BF mais empregado para o tratamento da osteoporose, além da hipercalemia associada a neoplasias ósseas e no controle da remodelação óssea desordenada que ocorre na doença de Paget, inibindo a reabsorção óssea, sem inibir de forma acentuada a mineralização (MERAW; REEVE; WOLLAN, 1999). Estudos

^a Dicionário informal: Dessorção é um fenómeno pelo qual uma substância é liberada de uma superfície. O processo é o oposto da absorção.

descrevem uma meia-vida do ácido alendrônico de aproximadamente 11 anos, semelhante à do cálcio e outros minerais presentes no osso (KHAN et al., 1997), mas ainda não se sabe se ele permanece biologicamente ativo (ENSRUD et al., 2004).

A má absorção a partir do trato gastrointestinal é uma característica comum a todos os BFs e, quando administrado com as refeições, especialmente na presença de cálcio e ferro, a sua absorção é reduzida significativamente. Pela via intravenosa, cerca de 20 a 30% da dose administrada permanece no corpo, sendo a maior parte no tecido ósseo. O alendronato remanescente é excretado na urina na sua forma inalterada, não sofrendo qualquer metabolização aparente (CASTRÉN-KORTEKANGAS et al., 1997).

2.2.1.1 Uso tópico do alendronato no tecido ósseo

O primeiro relato sobre a ação local do ALN sobre a reabsorção óssea foi descrito por Yaffe et al. (1995). Os autores compararam a ação tópica (0,15; 0,75 e 1,5 mg/mL) e sistêmica via endovenosa (0,5mg/Kg) do ALN. No lado teste, o ALN tópico foi aplicado sobre o rebordo alveolar em mandíbula de ratos após rebatimento do retalho mucoperiosteal. O ALN foi veiculado em esponjas de colágeno embebidas nas diferentes concentrações da substância, por 10 segundos. No lado controle, foi utilizada solução salina. A partir dos resultados obtidos por radiomicrografia de alta resolução, os autores não observaram diferença estatisticamente significativa na inibição da reabsorção óssea entre os grupos controle e teste na aplicação local do ALN. Entretanto, quando comparadas as vias de administração, a sistêmica apresentou redução significativa da reabsorção óssea.

Já em 1999, Yaffe et al. investigaram a eficácia da absorção do ALN aplicado topicamente. Após o descolamento do retalho mucoperiosteal na região de pré-molares e molares inferiores de ratos, uma esponja de gelatina embebida com 10 µL de ALN marcado radioativamente (1 µCi/mg) foi aplicada ao osso exposto no lado direito. No lado esquerdo (controle), foi aplicado a esponja de gelatina associada à solução salina apenas. As esponjas de gelatina permaneceram no local por 10 e 60 minutos, e os animais sacrificados nesses intervalos de tempo. Os resultados mostraram que 10% do conteúdo total de ALN da esponja de gelatina foi absorvido no

osso localmente, apoiando fortemente a hipótese de que a administração tópica do ALN pode representar uma modalidade de tratamento com o objetivo de evitar a reabsorção do osso durante procedimentos odontológicos e ortopédicos.

Binderman, Adut e Yaffe (2000) também avaliaram o efeito do ALN aplicado topicamente em cirurgias periodontais em ratos. Após o descolamento mucoperiosteal, foram inseridas esponjas de gelatina embebidas em ALN em diferentes concentrações (0, 1, 5, 20 ou 40 mg/mL), por um período de 2 horas. A redução da perda óssea foi observada nas concentrações a 20 mg/mL e 40 mg/mL. Entretanto, os melhores resultados foram obtidos na concentração de 20 mg/mL, visto que na concentração de 40 mg/mL observou-se o aumento da acidez local, interferindo na atividade antirreabsortiva do medicamento.

Gomes (2006) propôs avaliar a citotoxicidade do ALN em diferentes concentrações (0,5; 1; 5; 10; 20 e 40 mg/mL) sobre osteoblastos em cultura celular. Os resultados deste estudo demonstraram que o ALN adicionado à cultura de osteoblastos diminuiu a viabilidade celular em mais de 60% em relação ao grupo controle, e seguiram uma tendência dose dependente: a citotoxicidade do ALN foi diretamente proporcional a sua concentração. As células permaneceram viáveis em todos os tempos experimentais nas concentrações inferiores a 5 mg/mL, entretanto, no grupo tratado com 40 mg/mL a atividade mitocondrial não foi recuperada.

Toker et al. (2012) realizaram um estudo com 40 ratos, e em cada animal foi confeccionado um defeito ósseo padrão na calvária de 5 mm. No grupo controle, o defeito ósseo ficou vazio (sendo preenchido com coágulo sanguíneo), e o grupo experimental recebeu o ALN administrado sistêmica ou localmente, combinado com enxerto aloplástico bifásico de fosfato de cálcio. Todos os animais foram sacrificados após 8 semanas. Em relação a neoformação óssea, não foi observado diferença significativa entre a administração sistêmica ou local do ALN.

2.3 ASSOCIAÇÃO OSSO BOVINO LIOFILIZADO (BIO-OSS®) + BIFOSFONATOS

Houshmand et al. (2007) avaliaram se o pamidronato de sódio estimula a ação do Bio-Oss® no reparo de defeitos ósseos confeccionados na mandíbula de ovelhas (n=8), e encontraram uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos teste e

controle em relação à neoformação óssea. Foram realizados com trefina três defeitos de 6 mm de diâmetro na mandíbula de cada animal, e foram distribuídos em três grupos: controle negativo (coágulo sanguíneo), controle positivo (Bio-Oss®) e teste (1 mg de pamidronato de sódio - Aredia® 90 mg - dissolvido em 10 mL de água destilada, associado ao Bio-Oss®). Os animais foram sacrificados após 6 semanas e os resultados histomorfométricos demonstraram que a associação do pamidronato de sódio ao Bio-Oss® melhorou a formação óssea devido a um aumento da porcentagem de osso trabecular e diminuição significativa do número de osteoclastos no osso regenerado.

Rocha (2013) avaliou o efeito do ALN nas concentrações de 0,5 e 1% associados ao osso bovino inorgânico (Bio-Oss®) aplicado topicamente nos defeitos ósseos confeccionados em calvária de coelhos. Os resultados foram encontrados a partir de imagens obtidas por meio de radiomicrografias realizadas nos lados controle e experimental nos períodos de 30 e 60 dias. A adição do ALN, em ambas as concentrações, ao osso bovino inorgânico acelerou o processo de reparo ósseo quando comparado ao osso bovino isoladamente, sendo que na concentração de 0,5% promoveu maior porcentual de reparo ósseo.

Möller et al. (2014) realizaram um estudo em 8 porcos adultos, nos quais foram removidos 6 blocos ósseos corticoesponjosos do ramo mandibular bilateralmente (3 no lado teste e 3 no lado do controle) que, posteriormente, foram fixados no processo alveolar da mandíbula com parafusos de titânio. Após a fixação, eles foram cobertos no lado do teste com (1) membrana de colágeno Bio-Gide® impregnada com ALN em solução aquosa (1 mg/mL); (2) Bio-Oss® embebido em ALN em solução aquosa (1mg/mL), e (3) solução de ALN em solução aquosa (1 mg/mL). No lado controle foi realizado o mesmo o tratamento, exceto a aplicação tópica do BF. Os animais foram sacrificados após 12 semanas e, pela análise histológica, foi observado que o uso tópico do ALN reduziu a reabsorção óssea durante o processo de remodelação óssea. Entretanto, sinais de osteonecrose na parte inferior dos enxertos ósseos foram evidenciados, principalmente no grupo teste 2, sugerindo que a dose da solução do BF utilizada no estudo foi elevada. Os autores concluíram que é necessário realizar testes pré-clínicos e mais estudos, a fim de melhorar o método de aplicação tópica e otimizar a dosagem do fármaco a ser utilizado.

Mais recentemente, Kim et al. (2015) avaliaram em calvária de 36 ratos se a rhBMP-2^a e a aplicação tópica do ALN (em alta=10mM e baixa=1mM concentrações) apresentavam uma ação sinérgica na regeneração óssea quando associadas ao Bio-Oss[®]. Os animais foram sacrificados após 2, 4 e 8 semanas após a cirurgia. Eles observaram que a associação rhBMP-2 + ALN em baixa concentração + Bio-Oss[®] apresentaram melhores resultados pela redução da atividade de RANKL^b dos osteoblastos. Entretanto, eles concluíram que mais estudos são necessários a fim de descobrir a concentração ideal dos BFs para aplicação tópica nos defeito ósseo.

2.4 MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA

A micro-CT foi desenvolvida na década de 90 por meio de um escâner para avaliar pequenas amostras fornecendo imagens de alta resolução, tão pequenas quanto 1 µm. Essa técnica elevou o potencial para pesquisas em espécimes pequenos, e suscitou a possibilidade da realização de investigações tridimensionais por meio da representação virtual de uma amostra. A micro-CT foi validada como um método de avaliação e análise 3D do osso trabecular em 1998, após a comparação dos seus resultados com os resultados morfométricos obtidos pela histomorfometria convencional (MÜLLER et al., 1998).

Vários exames de imagem tem sido utilizados para avaliação da qualidade óssea. Para microestrutura óssea, a micro-CT foi recomendada como o padrão-ouro para avaliação da morfologia e microarquitetura óssea. No entanto, é limitada a pequenas amostras de osso, não existindo ainda aparelhos que realizem exames em pacientes. As múltiplas projeções de raios-X em diferentes angulações da micro-CT permitem uma reconstrução 3D precisa das amostras ósseas, possibilitando a avaliação do trabeculado ósseo. A micro-CT é usada para mensurar algumas variáveis histomorfométricas, incluindo volume ósseo, volume tecidual total, fração de volume ósseo, espessura e número de trabéculas ósseas e espaços trabeculares (IBRAHIM et al., 2013).

^a Cirano et al., 2007: a proteína óssea morfogenética é uma substância osteoindutora que inicia o desenvolvimento dos tecidos através da estimulação da conversão de células indiferenciadas em células condroprogenitoras e osteoprogenitoras.

^b moleculasosseas.blogspot.com.br: RANKL (ligante do receptor do fator nuclear kappa-B) é umas das vias que regula a osteoclastogênese, mediada pelos osteoblastos.

As imagens obtidas pela micro-CT são o resultado das diferenças nas propriedades de atenuação de raios-X nos espaços da medula óssea e nos tecidos moles (BURGHARDT; LINK; MAJUMDAR, 2011), que retratam a rede trabecular em diferentes níveis de cinza de acordo com seu conteúdo mineral (GENANT; JIANG, 2006; LESPESSAILLES et al., 2006).

A micro-CT tem sido utilizada para diferentes fins, como: (1) estudo do crescimento e desenvolvimento; (2) estudo de fenótipos esqueléticos em modelos de ratos; (3) estudo de camundongos geneticamente modificados; (4) estudos em modelos animais sobre osteoporose pós-menopausa ou distrofia renal; (5) estudos sobre interações farmacológicas; (6) estudos mecânicos relativos à força de carga e estresse; (7) estudos sobre a reparação de fraturas, e (8) estudos sobre a morfologia articular (BOUXSEIN et al., 2010). Outros autores utilizaram a micro-CT para avaliar a qualidade da obturação endodôntica do sistema de canais radiculares por técnicas diferentes (MARTINS et al., 2011) ou a presença de defeitos dentinários, como trincas, microtrincas e fraturas verticais das raízes (QUEIROZ, 2014).

Pesquisas *in vivo* em pequenos animais com câncer também tem utilizado a micro-CT, visto que é uma técnica não invasiva, apresenta alta resolução e rápidas aquisições, possibilitando o acompanhamento a longo prazo do animal (PAULUS et al., 2000).

Na odontologia, vários sistemas de classificação são utilizados para avaliar a qualidade óssea em exames de imagem, como as classificações de Lekholm e Zarb (1985), Misch (1989) e Trisi e Rao (1999), sendo a primeira largamente utilizada nos estudos de implantes dentários que analisam o osso trabecular. Um índice visual também foi proposto por Lindh, Petersson e Rohlin (1996), visando simplificar a classificação trabecular nas radiografias periapicais. Este índice classificou o padrão trabecular de acordo com os espaços intertrabeculares em pequenos ou grandes, além do grau de trabeculado em esparsos ou densos. No entanto, essas técnicas são subjetivas e ainda permanecem parcialmente validadas (RIBEIRO-ROTTA et al., 2011).

De Oliveira et al. (2012) instalaram 46 implantes na maxila e mandíbula em 32 voluntários, previamente avaliados por radiografias convencionais e TC. Durante a

instalação de cada implante, biópsias ósseas foram removidas com broca trefina na primeira perfuração. Posteriormente, cada amostra foi avaliada pela micro-CT para análise da microarquitetura e densidade óssea. Os autores concluíram que esses fatores podem influenciar potencialmente na estabilidade primária dos implantes dentários, sendo que os parâmetros relacionados à microarquitetura óssea podem revelar aspectos importantes das suas propriedades mecânicas, essenciais para o sucesso do implante.

Vandeweghe et al. (2013) compararam a micro-CT com a histomorfometria no intuito de avaliar sua precisão na determinação da resposta óssea a dois materiais de implante diferentes. Foram instalados 32 implantes em fêmur de coelhos, sendo 16 de titânio e 16 de hidroxiapatita. Depois de 2 e 4 semanas, os animais foram sacrificados e as amostras digitalizadas por meio da micro-CT com resolução 36 μm e analisadas tridimensionalmente em relação à área óssea e interface osso-implante. Todas as amostras foram seccionadas em uma espessura final de cerca de 40 μm e coradas com azul de toluidina para histomorfometria. A comparação direta mostrou que apenas no tempo de 2 semanas a área óssea para os implantes de titânio foi significativamente diferente entre as análises microtomográfica e histomorfométrica. Os autores concluíram que a micro-CT correspondeu com a histomorfometria e pode ser uma ferramenta valiosa para examinar tridimensionalmente a estrutura óssea ao redor dos implantes.

Verket et al. (2013) realizaram um ensaio clínico em 17 pacientes apresentando a altura do rebordo maxilar entre 3 e 6 mm, submetidos a elevação do assoalho do seio maxilar usando grânulos de titânio poroso, associado à instalação de 1 a 3 implantes. Seis meses após o procedimento cirúrgico, foi realizada biópsia do local enxertado e as amostras obtidas foram digitalizadas por meio da micro-CT, com cortes de espessura de 3 μm . Posteriormente, as amostras foram preparadas para análise histológica, com cortes de espessura de aproximadamente 70 μm , coradas com hematoxilina e eosina. As percentagens em volume ocupados por novo osso e por grânulos de titânio poroso na região de interesse foram de $19 \pm 5,8\%$ e $22,7 \pm 4,7\%$, respectivamente. Três diferentes gradientes de densidade foram observados nas amostras de micro-CT: uma de alta densidade, representada pelos grânulos de titânio poroso; de densidade média, representada pelo osso trabecular e, finalmente, uma de baixa densidade, representada pelo tecido não mineralizado. As imagens da micro-

CT demonstraram uma rede trabecular óssea densa unida à superfície dos grânulos. Já na análise histológica, as percentagens de osso neoformado e grânulos de titânio foram de $16,1 \pm 9,4\%$ e $25,9 \pm 6,1\%$, respectivamente.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do uso tópico do ALN a 0,5% isolado ou em associação ao osso bovino liofilizado (Bio-Oss®) sobre o reparo ósseo dos defeitos confeccionados em calvária de ratos, por meio de imagens tridimensionais da micro-CT.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter os parâmetros de qualidade óssea (volume tecidual total, densidade volumétrica e volume ósseo) do reparo das cavidades nos diferentes grupos, por meio da micro-CT;
- b) Obter os parâmetros de microarquitetura óssea (número de trabéculas ósseas, espessura trabecular e espaço entre as trabéculas ósseas) do reparo das cavidades nos diferentes grupos, por meio da micro-CT, e
- c) Comparar os parâmetros de qualidade e microarquitetura óssea entre os grupos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este trabalho foi realizado junto ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), dentro da Linha de Pesquisa Bases Biológicas e Clínicas em Odontologia, sendo desenvolvido após aprovação dos protocolos experimentais pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFES sob o protocolo nº 10/2014 (ANEXO A).

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

4.2 DELINEAMENTO DA PESQUISA

A presente pesquisa foi desenvolvida dentro do paradigma tradicional quantitativo, caracterizado como um estudo experimental verdadeiro, grupo controle/pós-teste, seguindo o seguinte delineamento (adaptado de CAMPBELL; STANLEY, 1979):

R X_{GA} O
 R X_{GAB} O
 R X_{GB} O
 R X_{GC} O; onde:

R= randomizado, X= tratamento (teste); X_{GA}= Grupo Alendronato; X_{GAB}= Grupo Alendronato + Bio-Oss®; X_{GB}= Grupo Bio-Oss®; X_{GC}= Grupo controle/coágulo sanguíneo; O = Observação (pós-teste) em 90 dias.

4.3 AMOSTRA E DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS

A amostra foi constituída por 18 ratos Wistar, machos, adultos, com peso corporal médio de 300 a 400g.

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 09 animais. Na calvária de cada animal foram confeccionadas duas cavidades, totalizando 36 defeitos ósseos. As cavidades ósseas foram distribuídas aleatoriamente de forma a constituir 4 grupos de acordo com o tratamento instituído, conforme exposto no QUADRO 02.

QUADRO 2 - Distribuição dos grupos de acordo com o tratamento instituído.

GRUPOS	n	SUBSTÂNCIA	CAVIDADE
GA	09	ALN 0,5%	Osso parietal Lado direito
GAB		ALN 0,5% + Bio-Oss®	Osso parietal Lado esquerdo
GB	09	Bio-Oss®	Osso parietal Lado direito
GC		Coágulo sanguíneo	Osso parietal Lado esquerdo

GA= Grupo A; GAB= Grupo AB; GB= Grupo B; GC= Grupo C; ALN= Alendronato de sódio; n= número de animais.

Os animais foram acondicionados em gaiolas coletivas de polipropileno com quatro ou cinco animais, sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade ($50 \pm 10\%$) e ciclo claro/escuro de 12h (7 - 19h), com acesso à água e alimentação padrão (MP-77, Primor) *ad libitum*, com limpeza a cada 2 dias.

4.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Biotério da UFES. Após a pesagem, os animais foram anestesiados com Cloridrato de Ketamina (0,05 mL/100 g)^a e

^a Ketamina Agener 10%®, Agener União – Saúde Animal, São Paulo - SP, Brasil

Cloridrato de Xilazina (0,025 mL/100 g)^a, por via intraperitoneal (FIGURA 4). Para profilaxia antibiótica foi utilizado Enrofloxacino 2,5% 10 mg/Kg^b via subcutânea, sob orientação do médico veterinário^c responsável-técnico pelo Biotério da UFES.

FIGURA 4 - Cloridrato de Ketamina (Ketamina Agener® e Cloridrato de Xilazina (Anasedan®) utilizados para anestesia geral e Enrofloxacino (Flotril®) para profilaxia antibiótica.



Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2016.

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

Como anestésico local, foi utilizado Cloridrato de Lidocaína a 2% com Epinefrina 1:100.000^f, sob infiltração anestésica subcutânea, com finalidade de hemostasia e analgesia transoperatória adicional, além de controle de dor no pós-operatório imediato. Após infiltração anestésica, utilizando lâmina de bisturi n° 15^g montada em

^a Anasedan injetável®, Sespo Indústria e Comércio Ltda., Paulínia - SP, Brasil

^b Flotril Injetável 2,5%®, Intervet Schering-Plough, São Paulo – SP, Brasil

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

^d Philips Style Shaver - QS6141/32, Philips, São Paulo – SP, Brasil

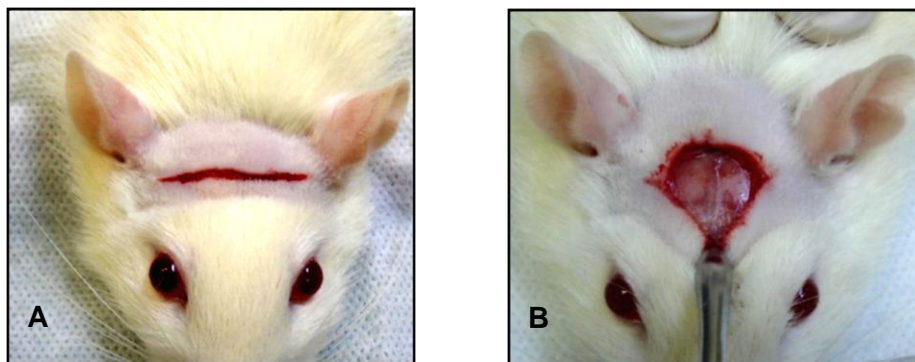
^e Riohex 2%®, Rioquímica Indústria Farmacêutica, São José do Rio Preto - SP, Brasil

^f Alphacaína 1:100®, DFL Indústria e Comercio S/A, Rio de Janeiro - RJ, Brasil

^g Solidor, Suzhou Kyuan Medical Apparatus Co.Ltd., Beiqiao Town, Suzhou City - China

cabo de bisturi Bard Parker nº 3, foi realizada uma incisão coronal linear medindo cerca de 1,5 cm de extensão, compreendida entre as orelhas (FIGURA 5A). Após esse procedimento, o periósteo foi descolado com o descolador de Molt e afastado juntamente com os demais tecidos, expondo a superfície externa da calvária (FIGURA 5B). Com auxílio de uma seringa descartável de 20 mL^a, a região foi irrigada com soro fisiológico a 0,9%^b, secando-se posteriormente com gaze estéril.

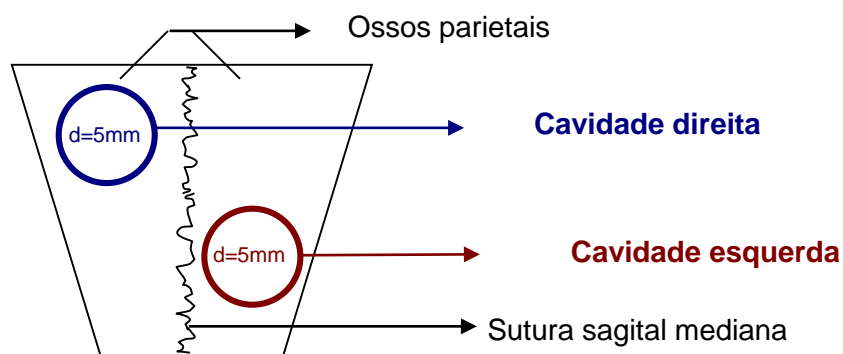
FIGURA 5 - A) Incisão dermoperiosteal entre os pavilhões auriculares após tricotomia. **B)** Descolamento do periósteo e exposição da calvária.



Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2016.

As duas cavidades com 5 mm de diâmetro, direita e esquerda, foram distribuídas lateralmente à sutura sagital mediana, nos ossos parietais (FIGURA 6).

FIGURA 6 - Representação esquemática da calvária do rato. Defeitos ósseos de 5mm de diâmetro (d) (cavidades direita e esquerda), confeccionados nos ossos parietais.



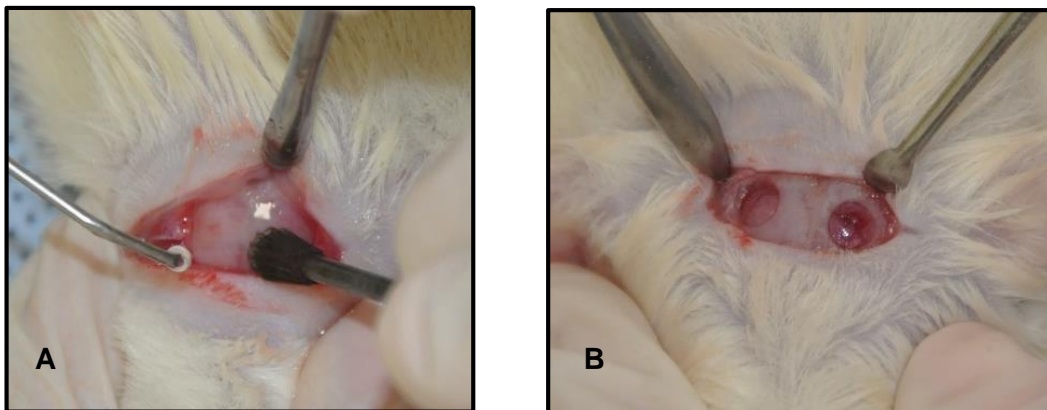
Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2016.

^a Seringa hipodérmica 20 mL, Injex Indústrias Cirúrgicas Ltda., Ourinhos - SP

^b Solução fisiológica 0,9%, Arboreto Laboratório Farmacêutico, Juiz de Fora - MG

Os defeitos ósseos foram confeccionados com broca multilaminada em formato de pêra com maior diâmetro de 5 mm (FIGURA 7A), correspondente ao tamanho dos defeitos ósseos. A broca foi montada em peça de mão reta e acionada por meio de um motor elétrico em baixa rotação, sendo pressionada perpendicularmente e levemente com movimentos intermitentes no sentido superoinferior, sob irrigação abundante com soro fisiológico 0,9%, promovendo o rompimento das corticais externa e interna da calvária, sem lesar as meninges (FIGURA 7B).

FIGURA 7 – A) Confeção das cavidades ósseas utilizando broca multilaminada em forma de pêra, em baixa rotação, sob irrigação com soro fisiológico. **B)** Cavidades ósseas direita e esquerda confeccionadas de cada lado da sutura sagital mediana.



Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2016.

Após a confecção das cavidades, essas foram irrigadas abundantemente com solução fisiológica para remoção dos resíduos gerados no processo de confecção dos defeitos e secadas com gaze estéril. Procedeu-se o tratamento em cada grupo, de acordo com o QUADRO 2:

Grupo A (GA = ALN 0,5%): 09 cavidades ósseas (do lado direito) foram preenchidas com ALN manipulado na concentração de 1,6 mg/L (0,5%)^a (ANEXO B) (FIGURA 8 A). Uma esponja de gelatina reabsorvível estéril^b (FIGURA 8 B) foi utilizada como veículo e manutenção do ALN na cavidade óssea. A esponja possuía 1mm de espessura e foi recortada em discos de 5mm de diâmetro. Os discos foram embebidos na solução de ALN e inseridos nas cavidades (FIGURA 8 C).

^a Pharmácia Específica Ltda., Bauru-SP

^b GelitaSpon®, Gelita® Medical, Amsterdam, Holanda,

FIGURA 8 – A) Solução de ALN 0,5%; **B)** Esponja de gelatina reabsorvível, utilizada como veículo para inserção e manutenção do ALN na cavidade óssea; **C)** Disco de esponja de gelatina de 5mm embebido na solução de ALN.



Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2016.

Grupo B (GB = Bio-Oss[®]): osso bovino liofilizado marca Bio-Oss[®]a (FIGURAS 9 A e 9 B), na granulação de 0,25 a 1mm foi inserido nas cavidades do lado direito de 09 animais. Após umidificado com solução salina, o biomaterial foi inserido com auxílio da cureta alveolar de Lucas delicadamente, de forma que não fosse comprimido excessivamente, mantendo espaço suficiente para a formação de novo osso (FIGURA 12 A).

FIGURA 9 – A) Ilustração dos grânulos de Bio-Oss[®] 0.25-1.0mm e **B)** Embalagem com especificações do enxerto ósseo bovino.



Fonte: www.geistlich.com.br

Grupo AB (GAB = ALN 0,5% + Bio-Oss[®]): os grânulos de Bio-Oss[®] foram embebidos na solução de ALN 0,5% e inseridos cavidades ósseas do lado esquerdo de 09 animais.

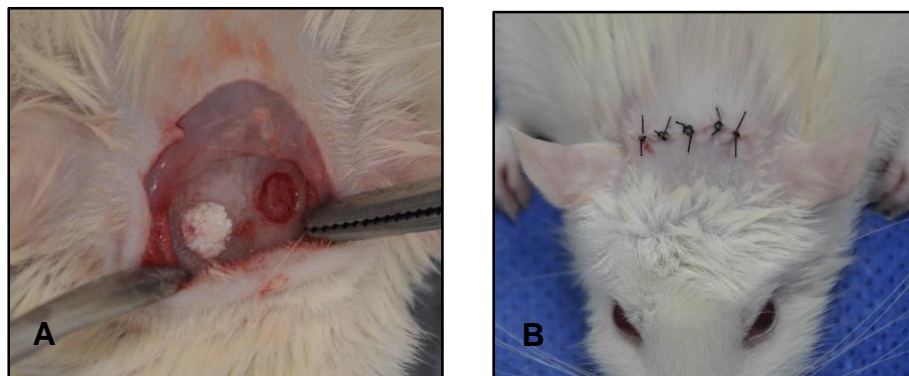
Grupo C (GC = Controle/Coágulo sanguíneo): no grupo controle não foram inseridas substâncias, as cavidades do lado esquerdo de 09 animais foram

^a Bio-Oss[®], Geistlich Pharma, Wolhusen - Suíça, <http://www.geistlich.com.br/>

preenchidas com coágulo sanguíneo autógeno proveniente do próprio leito cirúrgico (FIGURA 10A).

Os tecidos foram reposicionados de forma que o periósteo recobrisse as cavidades, e posteriormente suturados com fio nylon 5-0^a (FIGURA 10B) com pontos simples interrompidos, com o auxílio de um porta-agulha Mayo Hegar e uma pinça Adson Brown. A região foi limpa com gaze umedecida em soro fisiológico para remoção dos resíduos de sangue, e os animais colocados na posição de decúbito ventral em gaiolas individuais para recuperação da anestesia.

FIGURA 10 – A) Cavidade óssea direita preenchida com grânulos de Bio-Oss® e cavidade esquerda sem material (coágulo sanguíneo). **B)** Sutura com pontos isolados utilizando fio nylon 5-0.



Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2016.

Para controle da dor pós-operatória, foi utilizado o Paracetamol Gotas 200mg/Kg^b, via oral, imediatamente após o término do procedimento e por mais três dias, sendo adicionado ao recipiente de água de beber dos animais.

4.5 MORTE DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS PEÇAS OPERATÓRIAS

Alcançado o período de observação de 90 dias pós-operatórios, os animais foram sacrificados por meio de dose letal intramuscular de Cloridrato de Xilazina 15mg/Kg a 30mg/Kg e Cloridrato de Ketamina 150mg/Kg a 225mg/Kg.

Para obtenção da peça operatória, foi realizada uma incisão na região mais posterior dos tecidos moles da cabeça, com de lâmina de bisturi n° 15 montada em cabo Bard-

^a Shalon® Suturas, São Luis de Montes Belos – GO, <http://www.suturas.com.br/>

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

Parker nº 3, com o cuidado de não danificar a região óssea de interesse. O tecido mole sobre a calvária foi removido com o auxílio de tesoura Metzenbaum e pinça Adson Brown, promovendo uma ampla visualização da calvária, incluindo os ossos parietais. A remoção da calvária foi realizada por meio de osteotomia com uma broca nº 702 em baixa rotação, sob irrigação constante de solução fisiológica a 0,9%. A linha de osteotomia respeitou uma distância de 4 a 5 mm da área dos defeitos.

Realizadas as 04 linhas de osteotomia em torno dos defeitos ósseos, a parte de interesse da calvária foi removida com o auxílio de um descolador de Molt e uma pinça Adson Brown. Após exame macroscópico local, as peças operatórias foram armazenadas em recipientes plásticos contendo formalina neutra tamponada a 10% para fixação e conservação, com a finalidade de evitar as alterações *post mortem* dos tecidos, com identificação para cada animal e grupo correspondente.

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

4.6 ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA COMPUTADORIZADA

Para aquisição das imagens foi utilizado um aparelho de microtomografia computadorizada Skyscan 1072 (Kontich, Bélgica), pertencente ao laboratório de Nanobiotecnologia do Departamento de Morfologia e Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (FIGURA 11).

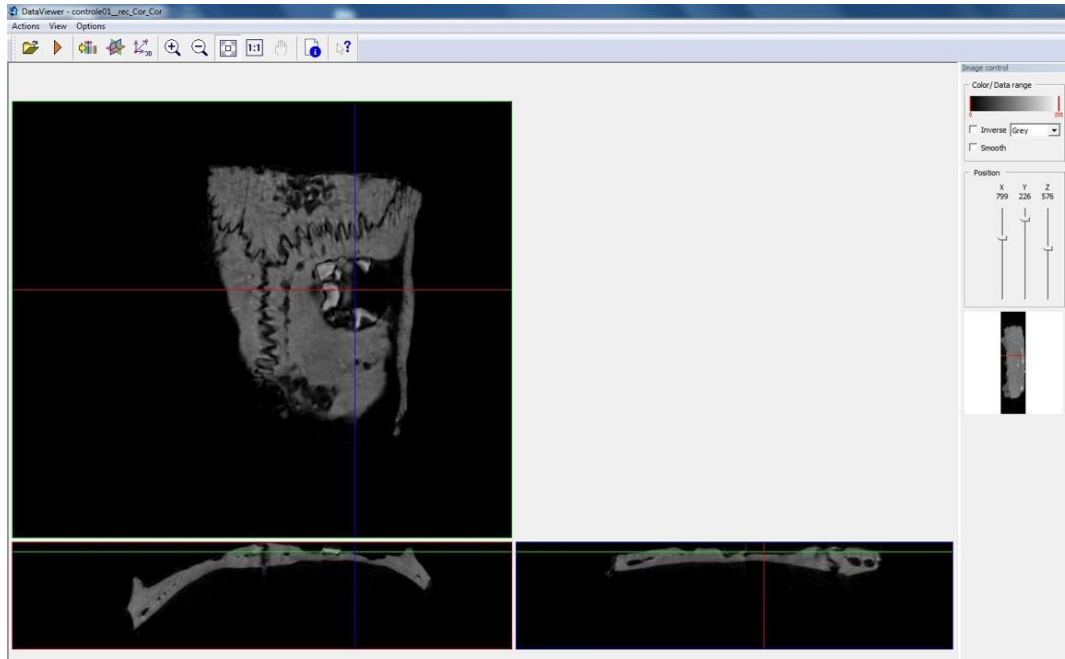
FIGURA 11 – Microtomógrafo Skyscan 1072 (Kontich, Bélgica).



Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2016.

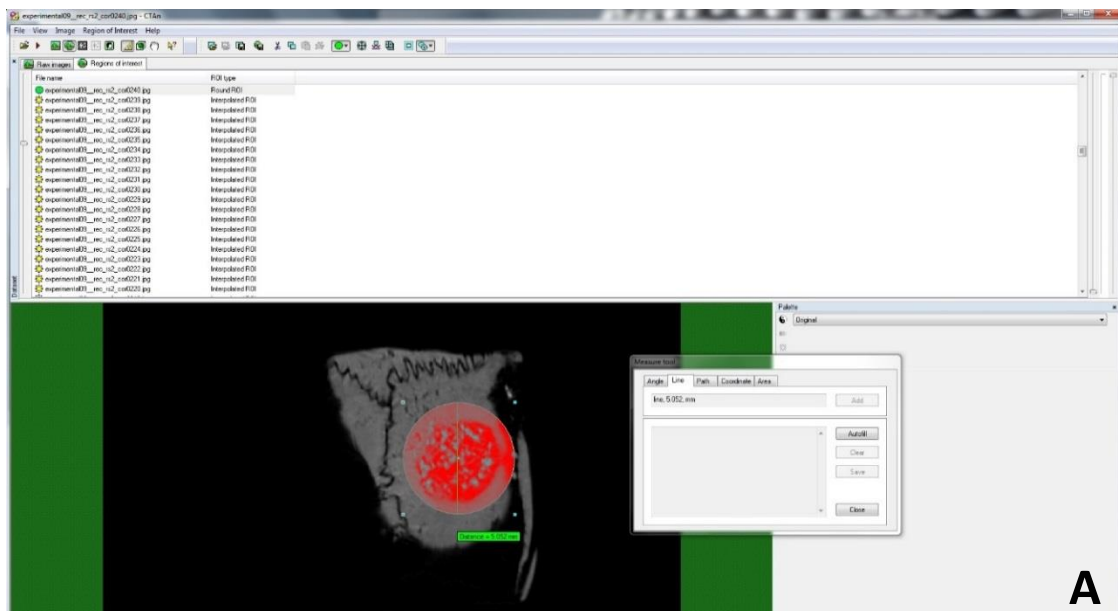
Antes da inserção das amostras na mesa do microtomógrafo, as calvárias foram colocadas isoladamente em recipientes com álcool 70% (álcool etílico hidratado 70°), e estabilizadas a sua base com gaze estéril para evitar qualquer tipo de movimentação durante a obtenção da imagem. Posteriormente, foram escaneadas com resolução isotrópica de 18 μm de tamanho do pixel, os níveis de energia dos raios-X foram fixados em 70 kV, a corrente de 142 μA , utilizando um filtro de alumínio com 0,5 mm de espessura para otimizar o contraste. O tempo de integração foi de 560ms, 180° de rotação, com quatro projeções radiográficas a cada 0,6° de rotação. As amostras permaneceram na câmara de exposição do aparelho durante todo o ciclo do escaneamento. Ao final do processo, as imagens obtidas foram reconstruídas utilizando o *software* NRecon (Bruker, Kontich, Bélgica). As imagens foram reposicionadas utilizando o *software* DataViewer (Bruker, Kontich, Bélgica) com a finalidade de alinhar os planos de corte, para que cada defeito fosse seccionado no seu longo eixo. O reposicionamento foi realizado para o lado direito e esquerdo separadamente, devido à forma convexa da calvária (FIGURA 12). Após o alinhamento, a região de interesse foi delimitada usando o *software* CTAnalyser (Bruker, Kontich, Bélgica) por meio de uma circunferência de 5 mm de diâmetro selecionada e posicionada na imagem de acordo com o centro do defeito e um novo *dataset* foi salvo, desta vez contendo apenas a região do defeito, incluindo o osso neoformado e o Bio-Oss®, quando presente (FIGURAS 13 A e B). A contagem de cortes entre o topo e a base do defeito totalizou 50 cortes, cerca de 0,9 mm de espessura.

FIGURA 12 – Reposicionamento das imagens com cortes atravessando o defeito no seu longo eixo, por meio do *software* DataViewer. Demonstração do lado esquerdo da calvária (Grupo AB).

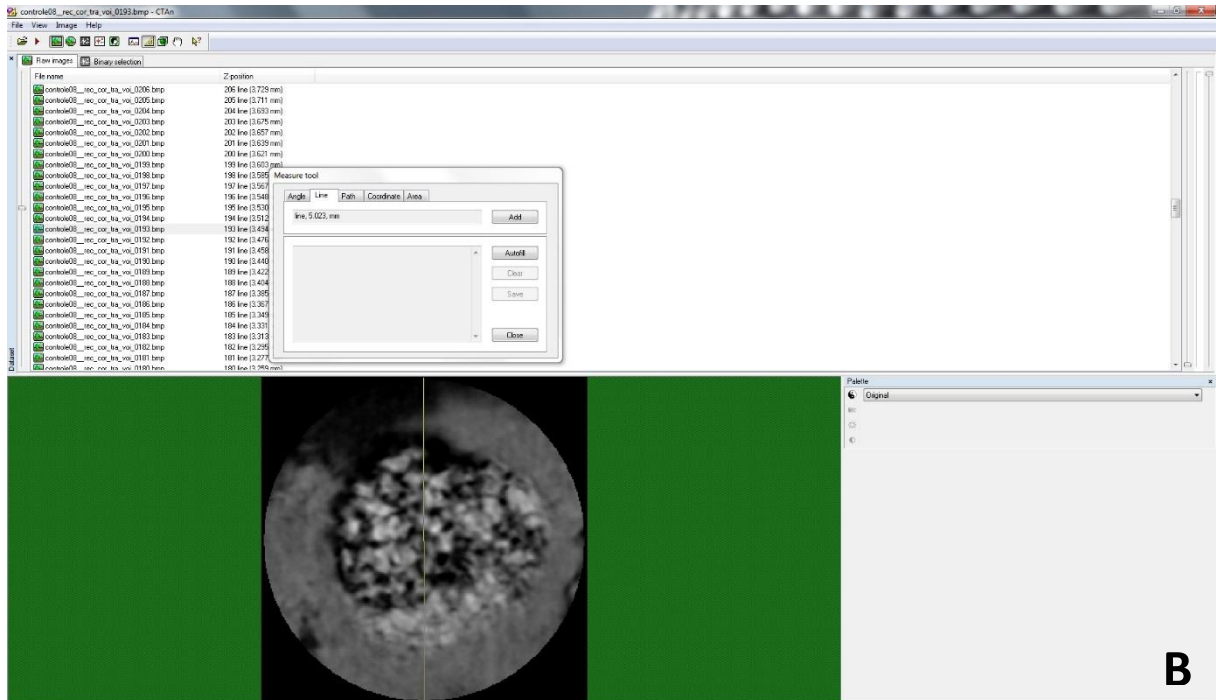


Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2016.

FIGURA 13 – A) Seleção da região de interesse feita em uma reconstrução axial após alinhamento da imagem pelo *software* CTAnalyser (Bruker, Kontich, Bélgica). Circunferência de 5mm de diâmetro posicionada na imagem de acordo com o centro do defeito. **B)** Seleção do defeito.



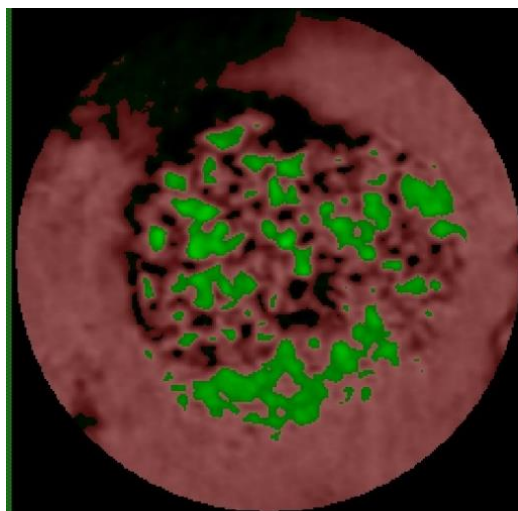
Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2016.



Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2016.

Com a seleção de *threshold* (algoritmo de segmentação, ou filtro de imagem, para selecionar a estrutura de interesse) aplicada, o osso foi selecionado em vermelho e o Bio-Oss[®] excluído em verde (FIGURAS 14 A). Para a seleção dos tons de cinza que representam o osso, foi determinado um *threshold* fixo de 40 a 120, excluindo-se assim o tom de cinza do Bio-oss[®], quando presente.

FIGURA 14 – Imagem tomográfica da área de interesse: osso neoformado selecionado em vermelho e grânulos de Bio-Oss[®] excluídos em verde.



Fonte: Dados da pesquisa. PPGCO/UFES, 2016.

Para avaliar a qualidade e a microarquitetura óssea, foram analisados alguns dos parâmetros descritos por Parfitt et al. (1987) e adaptado por de Oliveira et al. (2012) para micro-CT (Quadro 3).

QUADRO 3 – Parâmetros obtidos pela micro-CT relacionados à qualidade e microarquitetura óssea.

PARÂMETRO	SIGLA	DESCRIÇÃO
VOLUME DO OSSO	VO	Volume de tecido ósseo da amostra
VOLUME TECIDUAL TOTAL	VT	Volume tecidual total da amostra
DENSIDADE VOLUMÉTRICA DO OSSO	VO / VT	Fração do tecido ósseo no volume total da amostra. Parâmetro utilizado em situações que alteram a remodelação óssea, pois reflete o ganho/perda de osso.
ESPESSURA TRABECULAR	TB.TH	Espessura média das trabéculas ósseas
ESPAÇOS ENTRE AS TRABÉCULAS ÓSSEAS	TB.SP	Espaço entre as trabéculas ósseas
NÚMERO DE TRABÉCULAS ÓSSEAS	TB.N	Número de vezes que uma trabécula é atravessada por outras em um determinado comprimento selecionado de forma aleatória, em todo o volume do osso analisado

Fonte: Parfitt et al. (1987), adaptado por de Oliveira et al. (2012).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística deste trabalho foi realizada por meio de medidas de amplitude, tendência central e variabilidade (média e desvio padrão). Nas comparações dos parâmetros de qualidade e microarquitetura óssea foi utilizado o teste de ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey, para comparação entre os grupos (para avaliação de dados paramétricos). O nível de significância utilizado foi de 5% e intervalo de confiança de 95%.

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

5 RESULTADOS

As médias dos valores dos parâmetros de qualidade óssea (volume tecidual total, densidade volumétrica e volume ósseo), obtidos por meio da análise das imagens tridimensionais da micro-CT, estão representadas na TABELA 1.

TABELA 1 - Caracterização dos parâmetros de qualidade óssea obtidas pela micro-CT, em cada grupo.

GRUPOS	GA	GB	GAB	GC	P
PARÂMETROS	ALN 0,5%	Bio-Oss®	Bio-Oss® + ALN 0,5%	Coágulo sanguíneo	
Volume Ósseo (M em mm ³ ± DP)	9,78 ^{ab} ±2,93	12,74^b ±1,77	11,09 ^{ab} ±2,43	8,99^a ±2,58	0,016
Volume Tecidual Total (M em mm ³ ± DP)	26,72 ^a ±8,78	29,88 ^a ±7,39	27,11 ^a ±6,92	27,38 ^a ±7,21	0,812
Densidade Volumétrica do Osso (M em % ± DP)	37,34 ^a ±10,08	44,20 ^a ±8,02	42,19 ^a ±9,04	33,36 ^a ±9,15	0,070

M = Média; DP = Desvio Padrão; mm³ = milímetros cúbicos; ALN = Alendronato de Sódio; ANOVA/Teste de Tukey; p ≤ 0,05, diferença estatisticamente significativa para letras diferentes por parâmetros.

Quando observado o **volume ósseo**, o GB (12,74 ± 1,77 mm³) apresentou a maior média de neoformação óssea, seguido pelo GAB (11,09 ± 2,43 mm³), GA (9,78 ± 2,93 mm³) e, por último, o GC (8,99 ± 2,58 mm³). Entretanto, o teste de Tukey evidenciou diferença estatisticamente significativa apenas entre o GB e o GC (p=0,016).

Em relação ao **volume tecidual total** das cavidades ósseas em reparo, observou-se que os grupos apresentaram médias aproximadas entre si, sendo que o GB apresentou o maior resultado (29,88 ± 7,39 mm³), enquanto o GA (26,72 ± 8,78 mm³) o mais inferior deles, mostrando que houve menor preenchimento tecidual total no período de tempo observado, quando inserida esponja de gelatina embebida em solução de ALN 0,5% na cavidade óssea. No entanto, não houve diferença estatística entre os grupos para esta variável.

Quanto às médias do parâmetro de **densidade volumétrica do osso**, medida em percentagem, observou-se maior densidade nas cavidades preenchidas por Bio-Oss®, sendo que no uso do Bio-Oss® isolado o osso neoformado apresentou-se ligeiramente mais denso do que o Bio-Oss® associado ao ALN (GB = 44,20 ± 8,02% e GAB= 42,19 ± 9,04%), enquanto o GC (33,36 ± 9,15%) apresentou a menor média. Contudo, aplicando-se o teste de Tukey também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na densidade volumétrica do osso entre os grupos.

As médias dos valores dos parâmetros de microarquitetura óssea (número de trabéculas ósseas, espessura trabecular e espaço entre as trabéculas ósseas), obtidas por meio da análise das imagens tridimensionais da micro-CT, estão representadas na TABELA 2.

TABELA 2 - Caracterização dos parâmetros de microarquitetura óssea obtidas em cada grupo.

GRUPOS	GA	GB	GAB	GC	P
PARÂMETROS	ALN 0,5%	Bio-Oss®	Bio-Oss® + ALN 0,5%	Coágulo sanguíneo	
Número de Trabéculas Ósseas (M em mm⁻¹ ± DP)	0,64^a ±0,14	0,85 ^{ab} ±0,20	0,97^b ±0,28	0,65^a ±0,14	0,003
Espessura Trabecular (M em mm ± DP)	0,58^b ±0,09	0,53 ^{ab} ±0,07	0,45^a ±0,08	0,51 ^{ab} ±0,08	0,017
Espaços Entre as Trabéculas Ósseas (M em mm ± DP)	0,70 ^a ±0,23	0,58 ^a ±0,14	0,57 ^a ±0,22	0,76 ^a ±0,22	0,088

M = Média; DP = Desvio Padrão; mm⁻¹ = número de trabéculas por milímetro; ALN = Alendronato de Sódio; ANOVA/Teste de Tukey; p ≤ 0,05, diferença estatística significativa para letras diferentes por parâmetros.

Observou-se que o GAB e o GB apresentaram maior **número de trabéculas ósseas** por mm (0,97 ± 0,28 mm⁻¹ e 0,85 ± 0,20 mm⁻¹, respectivamente), sem diferença estatisticamente significativa entre eles. Os grupos GA e GC apresentaram valores inferiores e muito próximos (0,64 ± 0,14 mm⁻¹ e 0,65 ± 0,14 mm⁻¹, respectivamente), e com diferença estatisticamente significativa quando comparados ao GAB (p=0,003). Dessa forma, sugere-se que a presença do Bio-Oss® estimulou a formação de novas trabéculas ósseas nas cavidades em que foi inserido.

A **espessura trabecular** apresentou maiores médias no GA (0,58 ± 0,09 mm), seguida pelo GB (0,53 ± 0,07 mm) e GC (0,51 ± 0,08 mm), sendo que o GAB mostrou trabéculas menos espessas (0,45 ± 0,08 mm). Aplicando-se o teste de Tukey evidenciou-se diferença estatisticamente significativa entre as médias do GA e GAB (p=0,017).

Já em relação ao **espaço entre as trabéculas ósseas**, as médias evidenciaram maior espaçamento no GC (0,76 ± 0,22 mm), enquanto o GAB (0,57 ± 0,22 mm) demonstrou menor espaçamento. Apesar disso, nesse parâmetro não foi observado diferença estatística entre os grupos.

6 DISCUSSÃO

Os estudos que avaliaram o uso tópico de drogas surgiram com o objetivo de estabelecer uma dose ótima de uma substância bioativa precisamente no local onde é desejada, em vez de se distribuir excessivamente e de forma desnecessária por todo o corpo, através da circulação sistêmica (MÖLLER et al., 2014). Acredita-se que a aplicação local do ALN evita a maioria dos efeitos colaterais, proporcionando uma maior concentração local (KAWATA et al., 2004; SHARMA; PRADEEP, 2012a, b). Yaffe et al. (1999) observaram que 10% do conteúdo total do ALN é absorvido no osso localmente e uma única aplicação tópica do BF permite adequada distribuição do medicamento no osso devido a sua alta afinidade à parte mineral deste tecido.

O número de estudos sobre a ação e a efetividade da aplicação tópica do ALN tem sido cada vez mais crescente e tem como um dos objetivos substituir a sua administração sistêmica no intuito de minimizar efeitos colaterais, como esofagite, erosões, ulcerações (FLEISCH, 1998) e osteonecrose dos maxilares (MAAHS, 2008).

Na presente pesquisa, a concentração de 0,5% (5mg/mL) de ALN em dose única foi definida a partir de alguns trabalhos da literatura. Rocha (2013) testou duas concentrações de ALN (0,5 e 1%) adicionadas ao Bio-Oss® no preenchimento de defeitos ósseos em coelhos e observou, por meio da radiomicrografia, maior neoformação óssea na aplicação do BF na menor concentração (0,5%). Binderman, Adut e Yaffe (2000) analisaram os efeitos do ALN (0, 1, 5, 20 ou 40 mg/mL) em cirurgias periodontais veiculado em esponja de colágeno, e verificaram efeito positivo na aplicação tópica, com redução significativa da perda óssea alveolar, além de resultados dose dependentes. Quando utilizado em alta concentração (40 mg/mL) ocorreu interferência na atividade antirreabsortiva do medicamento. Gomes (2006) demonstrou que células osteoblásticas permaneceram viáveis quando o ALN foi utilizado nas concentrações inferiores a 5 mg/mL, e também constatou que na concentração de 40 mg/mL, a atividade mitocondrial dos osteoblastos não foi recuperada. Resultados favoráveis quanto ao reparo ósseo foram também observados por Komatsu et al. (2008), nos quais o ALN 1mM (que equivale a 0,32 mg/mL) aplicado topicamente reduziu de forma estatisticamente significativa a reabsorção óssea e radicular, além de estimular a formação de osso ao redor de dentes reimplantados. Sharma e Pradeep (2012a, b) observaram aumento na

formação óssea em pacientes com doença periodontal em concentrações ainda menores (10µl do ALN 1%, que equivale a 0,1mg/mL).

No GA, o ALN 0,5% foi inserido na cavidade cirúrgica utilizando como veículo esponja de gelatina, sendo que a neoformação óssea de 9,78 mm³ (± 2,93 mm³) observada na micro-CT pelo parâmetro volume ósseo, foi maior do que quando comparada ao GC (8,99 ± 2,58 mm³), mas sem significância estatística (TABELA 1). Do mesmo modo, nos achados de Rocha (2013) obtidos por meio da radiomicrografia, o uso tópico da solução de ALN 0,5% em calvária de coelhos, apesar de retardar o processo de reparo ósseo quando comparado ao grupo controle (coágulo sanguíneo), não apresentou significância estatística entre os grupos. Yaffe et al. (1995) também utilizaram a concentração de 0,75 mg/mL. Estes autores realizaram análise radiomicrográfica de alta resolução dos espécimes e não observaram diferença estatisticamente significativa na inibição da reabsorção do osso alveolar exposto entre os grupos controle e teste.

Os resultados do presente estudo mostraram que o GB apresentou volume ósseo maior que o GC (12,74 ± 1,77 mm³ e 8,99 ± 2,58 mm³, respectivamente), sendo esta diferença estatisticamente significativa (p=0,016). Rocha (2013) também encontrou maior percentual de osso neoformado no grupo Bio-Oss[®] do que no grupo controle (coágulo sanguíneo), mas cabe ressaltar que, devido à semelhança nos tons de cinza, neste último estudo os grânulos de Bio-Oss[®] foram computados juntamente com o osso neoformado, além da superposição de estruturas que é observada nas radiomicrografias. Outro fator importante a ser considerado é a dificuldade de se distinguir os limites exatos entre o osso neoformado e remanescentes do xenoinxerto ósseo também na micro-CT. Soardi et al. (2014) consideraram que identificar estes limites é ainda mais complexo no estágio avançado do reparo, no qual a radiolucência do enxerto residual aparece semelhante ao osso recém-formado, e no presente estudo a avaliação microtomográfica foi realizada aos 90 dias de pós-operatório. Este fenômeno já foi descrito anteriormente por Schmitt et al. (2013) que compararam diferentes substitutos ósseos usando radiomicrografia e histologia, onde não foi possível quantificar as partículas do aloenxerto utilizado devido à sua semelhança com o osso recém-formado. Da mesma forma, Chackartchi et al. (2011) relataram ser difícil distinguir na imagem microtomográfica os limites exatos entre as partículas de enxerto e osso neoformado.

Associada à maior neoformação óssea, a presença do Bio-Oss[®] no GB também lhe conferiu maior volume tecidual total ($29,88 \pm 7,39 \text{ mm}^3$) e consequente maior densidade volumétrica do osso ($44,20 \pm 8,02\%$), mas sem diferença estatisticamente significativa quando comparado aos demais grupos. Acredita-se que os grânulos do Bio-Oss[®] deem suporte para a normalização morfológica de uma área óssea traumatizada ou reabsorvida (SCHLEGEL; DONATH, 1998). A utilização dos substitutos ósseos não reabsorvíveis, como o Bio-Oss[®], resulta em uma composição final que consiste no substituto ósseo residual e osso recém-formado, não sendo uma estrutura óssea homogênea (MERKX; MALTHA; STOELINGA, 2003). Entretanto, a vantagem dessa situação é que esta estrutura representa uma proteção contra a reabsorção óssea, garantindo estabilidade a longo prazo (SCHMITT et al., 2015).

Há poucos relatos na literatura associando o Bio-Oss[®] aos BFs. De modo geral, estes estudos mostraram maior neoformação óssea devido ao aumento da percentagem do osso trabecular (HOUSHMAND et al., 2007; KIM et al., 2015), redução dos osteoclastos no osso regenerado (HOUSHMAND et al., 2007), além da menor reabsorção dos enxertos ósseos (MÖLLER et al., 2014). No presente estudo, a adição do ALN 0,5% ao Bio-Oss[®] mostrou valores próximos, porém menores e sem significância estatística, quando comparados ao GB em todos os parâmetros de qualidade óssea analisados. No estudo de Musso (2015), na análise histomorfométrica desta mesma amostra, o GB apresentou o percentual médio de neoformação óssea de $46,0 \pm 22,0\%$, enquanto que no grupo GAB foi de $29,9 \pm 17,8\%$, e estas diferenças também não foram significativas ($p > 0,05$). Entretanto, Rocha (2013) utilizou o ALN 0,5 % associado ao Bio-Oss[®] em calvária de coelhos, onde foi observado que esta associação aumentou o percentual de osso neoformado quando comparado ao osso bovino isoladamente. Resultados positivos também foram encontrados por Houshmand et al. (2007) que observaram, por meio de histomorfometria, que a adição do pamidronato ao Bio-Oss[®] melhorou as propriedades de osteocondução e regeneração deste material.

Observa-se que a concentração ideal do ALN na inibição da reabsorção óssea e no aumento da neoformação óssea ainda não está bem estabelecida na literatura, e que o efeito do ALN é dose dependente (MÖLLER et al., 2014; KIM et al., 2015). Os poucos estudos que analisaram a associação do BF com os enxertos ósseos de origem bovina no processo de reparo ósseo, ora mostraram resultados positivos

(HOUSHMAND et al., 2007; ROCHA, 2013), ora negativos (MÖLLER et al., 2014). Dessa forma, sugere-se mais estudos que analisem a aplicação tópica em outras concentrações, com o objetivo de reduzir a reabsorção e induzir maior neoformação do tecido ósseo.

A histomorfometria convencional, que consiste na análise histológica de espécimes biológicos e na aplicação do método estereológico, é descrita como a técnica "padrão-ouro" para análise de uma linhagem celular ou de um tecido em particular em um volume específico analisado (GIELKENS et al., 2008). Em diversos estudos experimentais, a análise histomorfométrica é utilizada para avaliar o processo de reparo ósseo (SRISUBUT et al., 2007; TOKER et al., 2012), como nos casos de doenças metabólicas ósseas, pois permite a identificação de alterações do reparo ósseo de forma direta e precisa, além de todos os mecanismos teciduais envolvidos (MAHL et al., 2009). Como observou Musso (2015), a análise histomorfométrica permitiu detectar a presença de osso neoformado no defeito criado nas calvárias de ratos, além de quantificar o tamanho da área de neoformação óssea, de tecido conjuntivo e a presença e área de grânulos do Bio-Oss® remanescentes. A importância desse tipo de análise foi confirmada nos estudos de Marzouk et al. (2007), que relataram ser uma análise quantitativa essencial para estudos que propõem avaliar a efetividade de novas modalidades terapêuticas na neoformação óssea. Entretanto, Gielkens et al. (2008) acrescentaram que algumas desvantagens, como alto custo, tempo gasto para a análise e a dificuldade de se adquirir o material biológico, limitam o seu uso.

Como alternativa à histomorfometria, vários exames de imagem já foram descritos, e a micro-CT foi validada como um método de avaliação e análise tridimensional do osso trabecular em 1998, após a comparação dos seus resultados com os achados morfométricos obtidos pela histomorfometria convencional (MÜLLER et al., 1998). No presente estudo, a micro-CT foi utilizada para avaliar os parâmetros de qualidade e microarquitetura óssea. A micro-CT tem sido considerada padrão-ouro para as pesquisas que avaliam os locais de instalações de implantes em *ex-vivo* (YIP; SCHNEIDER; ROBERTS, 2004). González-García e Monje (2013a) compararam a micro-CT com a histomorfometria convencional com base estereológica e concluíram que a micro-CT é uma técnica confiável para determinar a densidade óssea e a microestrutura do osso alveolar da maxila para instalação de implante dentário.

Quanto à densidade óssea, pode-se esperar que ossos mais densos estejam relacionados ao volume ósseo mais elevado (DE OLIVEIRA et al., 2012). Isso foi observado no presente estudo, onde as médias dos parâmetros de volume e densidade volumétrica do osso obtiveram maiores valores nas cavidades preenchidas por Bio-Oss® isoladamente (GB). Embora estudos sugiram uma correlação direta entre a qualidade óssea e o sucesso do tratamento com implantes, a importância da análise dos diferentes parâmetros de qualidade óssea alveolar para instalação de implantes ainda não é totalmente compreendida (JAFFIN; BERMAN, 1991; JEMT; LEKHOLM, 1993). Assim, o uso isolado do Bio-Oss®, sem a associação do ALN 0,5%, sugeriu oferecer o melhor leito para a instalação de implantes, no entanto, a densidade óssea por si só não representa totalmente a qualidade do osso e deve ser considerada conjuntamente com a sua microarquitetura para estimar a força e resistência óssea (DIEDERICHS et al., 2009). Ulrich et al. (1999) mencionaram que a micro-CT possui a capacidade de avaliar o papel da arquitetura trabecular nas propriedades mecânicas do osso por meio da avaliação de parâmetros específicos em 3D. Isso também foi defendido por Fanuscu e Chang (2004), que alegaram que a micro-CT avalia a qualidade óssea de maneira satisfatória, fornecendo dados microestruturais objetivos e quantitativos.

Em relação à microarquitetura óssea, existem várias possibilidades de configuração da organização trabecular, sendo que cada amostra pode ter um padrão individual. Por exemplo, ossos mais densos podem apresentar um menor número de trabéculas ósseas, além de serem menos espessas, ou ainda ossos menos densos apresentarem-se com maior quantidade e espessura de trabéculas, porém com espaços intertrabeculares mais extensos (DE OLIVEIRA et al., 2012). Isto se confirmou na presente pesquisa, na qual as médias do parâmetro de densidade volumétrica do osso foram maiores nas amostras em que as cavidades foram preenchidas por Bio-Oss® (GB e GAB), enquanto que as trabéculas mais espessas foram observadas nas cavidades preenchidas apenas pelo ALN tópico (GA $0,58 \pm 0,09$ mm), mesmo apesar de possuir o menor número de trabéculas ($0,64 \pm 0,14$ mm⁻¹) (TABELA 2). Quando o ALN foi adicionado ao Bio-Oss® (GAB), o osso neoformado apresentou-se com maior número de trabéculas ($0,97 \pm 0,14$ mm⁻¹) e menor espessura trabecular ($0,45 \pm 0,08$ mm), porém sem diferença significativa em relação ao uso do Bio-Oss® isolado (GB).

A resistência óssea tem um papel significativo na determinação do sucesso do implante. Para melhorar a previsão da resistência óssea, as medidas da densidade trabecular e microestrutura trabecular devem ser combinadas (MÜLLER, 2003), porém nem sempre estão correlacionadas. Dessa forma, nem sempre a densidade óssea elevada corresponderá a altos parâmetros trabeculares, como maior número de trabéculas ósseas e espessura trabecular. Assim, a estimativa de sucesso do implante apenas por meio da avaliação da densidade trabecular não é indicada (DE OLIVEIRA et al., 2012). A densidade mineral óssea e a microestrutura trabecular são os preditores mais fortes da resistência óssea (MÜLLER, 2003), e devem ser avaliados de forma simultânea para melhor estimativa (DIEDERICHS et al., 2009).

A qualidade óssea, referente à combinação de todas as características ósseas que influenciam na resistência do osso à fratura, é um dos fatores mais importantes para a estabilidade primária do implante (OZAN; TURKYILMAZ; YILMAZ, 2007). O termo "qualidade óssea" vem sendo utilizado extensivamente na literatura para descrever diferentes aspectos das características ósseas, apresentando diferentes definições, dependendo do contexto. Dentre os fatores que influenciam a qualidade óssea, está o osso trabecular (COMPSTON, 2006; LICATA, 2009), que é a unidade anatômica e funcional primária do osso esponjoso. O osso cortical contribui para a obtenção da estabilidade primária do implante, enquanto que o osso esponjoso apresenta uma taxa de *turnover* mais acentuada (SAKKA; COULTHARD, 2009), além de estar em contato direto com a maior parte da superfície do implante, influenciando no processo de cicatrização e osseointegração implante - superfície óssea (FANUSCU; CHANG, 2004).

O conhecimento sobre microarquitetura trabecular pode fornecer informação sobre aspectos mecânicos do osso e sua influência no prognóstico dos implantes dentários (OHASHI et al. 2010). O método de referência para análise da microestrutura óssea foi descrito por Parfitt et al. (1987), a partir de imagens histológicas, e permite a avaliação e mensuração do perímetro e área trabeculares. Dessa forma, a análise da imagem é realizada com o objetivo de calcular os parâmetros morfométricos do osso para cada volume de interesse.

Embora exista um rápido progresso nos exames de imagem para análise da estrutura óssea, o emprego clínico permanece limitado devido às características técnicas, custo

e complexidade dos procedimentos (IBRAHIM et al., 2013). O uso da tomografia computadorizada *cone beam* (TCCB) no planejamento de cirurgias para instalação de implante dentário é crescente, e a sua validação quanto a análise da qualidade óssea tem sido estudada amplamente. Parsa et al. (2015) constataram uma excelente correlação entre a densidade óssea e fração de volume ósseo, avaliadas pela micro-CT e TCCB, sugerindo que esse exame de imagem pode ser utilizado para avaliação do local de instalação do implante dentário. Corpas et al. (2011) sugeriram a aplicação da TCCB para análise da microestrutura trabecular óssea. Entretanto, a sua confiabilidade na avaliação da qualidade óssea ainda permanece controversa. Ibrahim et al. (2013) sugeriram que mais estudos ainda são necessários para validar a TCCB como exame imaginológico na avaliação da microestrutura trabecular nos locais de instalação de implantes dentários, pois é necessário avaliar a influência do FOV (*field of view*), as configurações de digitalização e artefatos de imagem sobre a visibilidade da microestrutura trabecular. Para Schulze et al. (2011), o excesso de espalhamento e a presença de artefatos observados a tornam não confiável para mensuração da densidade mineral óssea.

A micro-CT representa um potente adjuvante para análise biomecânica do tecido ósseo. Enquanto escâneres de TC produzem imagens compostas de 1mm^3 de elementos de volume (*voxels*), a micro-CT produz melhor resolução da imagem, com cerca de 10^5 vezes menor do que a digitalização da TC convencional (RIBEIRO-ROTTA et al., 2011).

As principais vantagens da micro-CT em relação à histomorfometria são: (1) menor tempo para análise, pois não é necessária a descalcificação; (2) a técnica não é destrutiva e as biópsias podem ser utilizadas em outras análises posteriormente ou em testes mecânicos, e (3) a mineralização do osso pode ser estimada pela comparação da atenuação dos raios-x na hidroxiapatita (GONZALEZ-GARCÍA; MONJE, 2013a, b). Müller et al. (1998) acrescentou que a micro-CT apresenta uma resolução de até $1\ \mu\text{m}$, em contraste com a TC médica e a histomorfometria que apresentam resoluções de 250 e $14\ \mu\text{m}$, respectivamente, devendo ser a técnica de escolha para a avaliação da microestrutura trabecular do tecido ósseo (FAJARDO et al., 2009; GONZALEZ-GARCÍA; MONJE, 2013a, b).

Entretanto, ao contrário da análise histomorfométrica, a micro-CT não fornece informações sobre a avaliação do tecido osteóide, osteoblastos e osteoclastos, resultando em falta de dados sobre a dinâmica óssea (GONZALEZ-GARCÍA; MONJE, 2013a, b). Para Vandeweghe et al. (2013), embora tenha as suas limitações, a micro-CT corresponde satisfatoriamente com a histomorfometria e deve ser considerada uma ferramenta para avaliar a estrutura óssea previamente à instalação de implantes. Eventuais diferenças entre a micro-CT e histomorfometria podem depender da direção e da espessura dos cortes histológicos, bem como derivar da aquisição das imagens 3D.

A micro-CT tem se mostrado um método de diagnóstico por imagem auxiliar importante, pois permite a análise da qualidade óssea de maneira satisfatória, fornecendo dados microestruturais. Até o momento, a micro-CT não substitui completamente a análise histológica, porém com uma finalidade semelhante à análise histomorfométrica, a imagem da micro-CT é ainda limitada a pequenas amostras (BURGHARDT; LINK; MAJUMDAR, 2011), e permite ao clínico analisar a estrutura tridimensional do osso em biópsias humanas e em modelos experimentais (MÜLLER et al., 1998), não sendo utilizada em pacientes (BURGHARDT; LINK; MAJUMDAR, 2011). Devido às limitações apresentadas, o avanço das pesquisas deve direcionar sua aplicação na prática clínica.

7 CONCLUSÕES

Na análise 3D do reparo ósseo por meio da micro-CT, o uso tópico do ALN 0,5% isolado promoveu trabéculas ósseas em menor número, porém mais espessas do que quando associada ao Bio-Oss®. A adição do ALN 0,5% ao Bio-Oss® não alterou o espaçamento entre as trabéculas e os parâmetros de qualidade óssea obtidos pela micro-CT. O uso do Bio-Oss®, isoladamente ou associado ao ALN 0,5%, nas cavidades ósseas permitiu melhores resultados em relação ao volume ósseo.

REFERÊNCIAS

1. BENKE, D.; OLAH, A. E.; MÖHLER, H. Protein-chemical analysis of Bio-Oss bone substitute and evidence on its carbonated content. **Biomaterials**, Amsterdã, v. 22, n. 9, p. 1005-12, May. 2001.
2. BINDERMAN, I.; ADUT, M.; YAFFE, A. Effectiveness of local delivery of alendronate in reducing alveolar bone loss following periodontal surgery in rats. **J Periodontol**, Chicago, v. 71, n. 8, p. 1236-40, Aug. 2000.
3. BOUXSEIN, M. L.; BOYD, S.; CHRISTIANSEN, B. A.; GULDBERG, R. E.; JEPSEN, K. J.; MÜLLER, R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **J Bone Miner Res**, Washington, v. 25, n. 7, p. 1468-86, Jul. 2010.
4. BOYNE, P. J. **Osseous reconstruction of the maxilla and the mandible**. Chicago: Quintessence, 1997. 105 páginas.
5. BRYDONE, A. S.; MEEK, D.; MACLAINE, S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. **Proc Inst Mech Eng H**, Londres, v. 224, n. 1, p. 1329-43, Dec. 2010.
6. BURGHARDT, A. J.; LINK, T. M.; MAJUMDAR, S. High-resolution computed tomography for clinical imaging of bone microarchitecture. **Clin Orthop Relat Res**, Nova Iorque, v. 469, n. 8, p. 2179-93, Aug. 2011.
7. CAMPBELL, D. T.; STANLEY, J. C. **Delineamentos experimentais e quase-experimentais de pesquisa**. São Paulo: EPU: Ed. da Universidade de São Paulo, 1979.
8. CASTRÉN-KORTEKANGAS, P.; LÖYTTYNIEMI, E.; LIUKKO-SIPI, S.; JUHAKOSKI, A.; SMAL, J.; LAITINEN, K. Pooling of clodronate urinary excretion data: a new pharmacokinetic method to study drugs with highly variable gastrointestinal absorption. **J Bone Miner Res**, Washington, v. 12, n. 1, p. 66-71, Jan. 1997.
9. CHACKARTCHI, T.; IEZZI, G.; GOLDSTEIN, M.; KLINGER, A.; SOSKOLNE, A.; PIATTELLI, A.; SHAPIRA, L. Sinus floor augmentation using large (1-2 mm) or small (0.25-1 mm) bovine bone mineral particles: a prospective, intra-individual controlled clinical, micro-computerized tomography and histomorphometric study. **Clin Oral Implants Res**, Copenhagen, v. 22, n. 5, p. 473-80, May. 2011.
10. COMPSTON, J. Bone quality: what is it and how is it measured? **Arq Bras Endocrinol Metabol**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 4, p. 579-85, Aug. 2006.
11. CORPAS, L.S.; JACOBS, R.; QUIRYNEN, M.; HUANG, Y.; NAERT, I.; DUYCK, J. Peri-implant bone tissue assessment by comparing the outcome of intra-oral radiograph and cone beam computed tomography analyses to the histological standard. **Clin Oral Implants Res**, Copenhagen, v. 22, n. 5, p. 492-9, May. 2011.

12. COXON, F. P.; THOMPSON, K.; ROGERS, M. J. Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates. **Curr Opin Pharmacol**, Oxford, v. 6, n. 3, p. 307-12, Jun. 2006.
13. CREMERS, S.; PAPAPOULOS, S. Pharmacology of bisphosphonates. **Bone**, Nova Iorque, v. 49, n. 1, p. 42-9, Jul. 2011.
14. DA CRUZ, G.; DE TOLEDO, S.; SALLUM, E.; DE LIMA, A. Morphological and chemical analysis of bone substitutes by scanning electron microscopy and microanalysis by spectroscopy of dispersion energy. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v. 18, n. 2, p. 129-33, 2007.
15. DE OLIVEIRA, R. C.; LELES, C.R.; LINDH, C.; RIBEIRO-ROTTA, R. F. Bone tissue microarchitectural characteristics at dental implant sites. Part 1: identification of clinical-related parameters. **Clin Oral Implants Res**, Copenhagen, v. 23, n. 8, p. 981-6, Aug. 2012.
16. DIEDERICHS, G.; LINK, T. M.; KENTENICH, M.; SCHWIEGER, K.; HUBER, M. B.; BURGHARDT, A. J.; MAJUMDAR, S.; ROGALLA, P.; ISSEVER, A. S. Assessment of trabecular bone structure of the calcaneus using multi-detector CT: correlation with microCT and biomechanical testing. **Bone**, Nova Iorque, v. 44, n. 5, p. 976-83, May. 2009.
17. DRAKE, M. T.; CLARKE, B. L.; KHOSLA, S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. **Mayo Clin Proc**, Oxford, v. 83, n. 9, p. 1032-45, Sep. 2008.
18. ELGALI, I.; IGAWA, K.; PALMQUIST, A.; LENNERÅS, M.; XIA, W.; CHOI, S.; CHUNG, U. I.; OMAR, O.; THOMSEN, P. Molecular and structural patterns of bone regeneration in surgically created defects containing bone substitutes. **Biomaterials**, Amsterdã, v. 35, n. 10, p. 3229-42, Mar. 2014.
19. ENJUANES, A.; RUIZ-GASPÀ, S.; PERIS, P.; OZALLA, D.; ÁLVAREZ, L.; COMBALIA, A.; DE OSABA, M. J. M.; MONEGAL, A.; PARES, A.; GUAÑABENS, N. The effect of the alendronate on OPG/RANKL system in differentiated primary human osteoblasts. **Endocrine**, Totowa, v. 37, n. 1, p. 180-6, Feb. 2010.
20. ENSRUD, K. E.; BARRETT-CONNOR, E. L.; SCHWARTZ, A.; SANTORA, A. C.; BAUER, D. C.; SURYAWANSHI, S.; FELDSTEIN, A.; HASKELL, W. L.; HOCHBERG, M. C.; TORNER, J. C.; LOMBARDI, A.; BLACK, D. M. Randomized trial of effect of alendronate continuation versus discontinuation in women with low BMD: results from the Fracture Intervention Trial long-term extension. **J Bone Miner Res**, Washington, v. 19, n. 8, p. 1259-69, Aug. 2004.
21. FAJARDO, R. J.; CORY, E.; PATEL, N. D.; NAZARIAN, A.; LAIB, A.; MANOHARAN, R. K.; SCHMITZ, J. E.; DESILVA, J. M.; MACLATCHY, L. M.; SNYDER, B. D.; BOUXSEIN, M. L. Specimen size and porosity can introduce error into microCT-based tissue mineral density measurements. **Bone**, Nova Iorque, v. 44, n. 1, p. 176-84, Jan. 2009.

22. FANUSCU, M. I.; CHANG, T. L. Three-dimensional morphometric analysis of human cadaver bone: microstructural data from maxilla and mandible. *Clin Oral Implants Res*, Copenhagen, v. 15, n. 2, p. 213-8, Apr. 2004.
23. FERNANDES, C.; LEITE, R. S.; LANÇAS, F. M. Bifosfonatos: Síntese, Análises Químicas e Aplicações Farmacológicas. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 274-80, Mar. 2005.
24. FLEISCH, H. Bisphosphonates: Mechanisms of Action. **Endocrine Reviews**, v. 19, n. 1, p. 80-100, 1998.
25. GALGUT, P. N.; WAITE, I. M.; TINKLER, S. M. Histological investigation of the tissue response to hydroxyapatite used as an implant material in periodontal treatment. **Clin Mater**, Londres, v. 6, n. 2, p. 105-21, 1990.
26. GALIA, C. R.; LOURENÇO, A. L.; ROSITO, R.; MACEDO, C. A. S.; CAMARGO, L. M. A. Q. Caracterização físico-química do enxerto de osso bovino liofilizado. **Rev bras ortop**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. :444-51, 2011.
27. GENANT, H. K.; JIANG, Y. Advanced imaging assessment of bone quality. **Ann N Y Acad Sci**, Nova Iorque, v. 1068, p. 410-28, Apr. 2006.
28. GIELKENS, P. F.; SCHORTINGHUIS, J.; DE JONG, J. R.; HUYSMANS, M. C.; LEEUWEN, M. B.; RAGHOEBAR, G. M.; BOSS, R. R.; STEGENGA, B. A comparison of micro-CT, microradiography and histomorphometry in bone research. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 53, n. 6, p. 558-66, Jun. 2008.
29. GOMES, G. H. **Avaliação *in vitro* da citotoxicidade do alendronato de sódio sobre osteoblastos em cultura celular**. 2006. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
30. GONZALEZ-GARCÍA, R.; MONJE, F. Is microcomputed tomography reliable to determine the microstructure of the maxillary alveolar bone? **Clin Oral Implants Res**, Copenhagen, v.24, n. 7, p. 730-7, Jul. 2013a.
31. GONZALEZ-GARCÍA, R.; MONJE, F. The reliability of cone-beam computed tomography to assess bone density at dental implant recipient sites: a histomorphometric analysis by micro-ct. **Clin Oral Implants Res**, Copenhagen, v. 24, n. 8, p. 871-9, Aug. 2013b.
32. HOUSHMAND, B.; RAHIMI, H.; GHANAVATI, F.; ALISADR, A.; ESLAMI, B. Boosting effect of bisphosphonates on osteoconductive materials: a histologic *in vivo* evaluation. **J Periodontol Res**, Copenhagen, v.42, n. 2, p. 119-123, Apr. 2007.
33. IBRAHIM, N.; PARSANI, A.; HASSAN, B.; VAN DER STELT, P.; WISMEIJER, D. Diagnostic imaging of trabecular bone microstructure for oral implants: a literature review. *Dentomaxillofac Radiol*, Erlangen, v. 42, n. 3, 2013.
34. JAFFIN, R. A.; BERMAN, C. L. The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: a 5-year analysis. *J Periodontol*, Chicago, v. 62, n. 1, p. 2-4, Jan. 1991.

35. JEMT, T.; LEKHOLM, U. Oral implant treatment in posterior partially edentulous jaws: a 5-year follow-up report. *Int J Oral Maxillofac Implants*, Lombard, v. 8, n. 6, p. 635-40, 1993.
36. KANIS, J. A.; BURLET, N.; COOPER, C.; DELMAS, P. D.; REGINSTER, J. Y.; BORGSTROM, F.; RIZZOLI, R. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. **Osteoporosis Int**, Londres, v. 19, n. 4, p. 399-428, Apr. 2008.
37. KAWATA, T.; TENJOU, K.; TOKIMASA, C.; FUJITA, T.; KAKU, M.; MATSUKI, A.; KOHNO, S.; TSUTSUI, K.; OHTANI, J.; MOTOKAWA, M.; SHIGEKAWA, M.; TOHMA, Y.; TANNE, K. et al. Effect of alendronate on osteoclast differentiation and bone volume in transplanted bone. **Exp Anim**, Toquio, v. 53, n.1, p. 47-51, 2004.
38. KHAN, S. A.; KANIS, J. A.; VASIKARAN, S.; KLINE, W. F.; MATUSZEWSKI, B. K.; MCCLOSKEY, E. V.; BENETON, M. N.; GERTZ, B. J.; SCIBERRAS, D. G.; HOLLAND, S. D.; ORGEE, J.; COOMBES, G. M.; ROGERS, S. R.; PORRAS, A. G. Elimination and biochemical responses to intravenous alendronate in postmenopausal osteoporosis. **J Bone Miner Res**, Washington, v. 12, n. 10, p. 1700-7, Oct. 1997.
39. KIM, H. C.; SONG, J. M.; KIM, C. J.; YOON, S. Y.; KIM, I. R.; PARK, B. S.; SHIN, S. H. Combined effect of bisphosphonate and recombinant human bone morphogenetic protein 2 on bone healing of rat calvarial defects. **Maxillofac Plast Reconstr Surg**, Seul, v. 37, n. 1, p. 1-7, Jul. 2015.
40. KOMATSU, K.; SHIMADA, A.; SHIBATA, T.; SHIMODA, S.; OIDA, S.; KAWASAKI, K.; NIFUJI, A. Long-term effects of local pretreatment with alendronate on healing of replanted rat teeth. **J Periodontal Res**, Copenhagen, v. 43, p. 194–200, 2008.
41. LESPESSAILLES, E.; CHAPPARD, C.; BONNET, N.; BENHAMOU, C. L. Imaging techniques for evaluating bone microarchitecture. **Joint Bone Spine**, Paris, v. 73, n. 3, p. 254-61, May. 2006.
42. LI, J. Y.; POW, E. H.; Zheng, L. W.; Ma, L.; Kwong, D. L.; Cheung, L. K. Quantitative analysis of titanium-induced artifacts and correlated factors during micro-CT scanning. **Clin Oral Implants Res**, Copenhagen, v. 25, n. 4, p. 506-10, Apr. 2014.
43. LICATA, A. Bone density vs bone quality: what's a clinician to do? *Cleve Clin J Med*, Cleveland, v. 76, n. 6, p. 331-6, Jun. 2009.
44. LINDH, C.; PETERSSON, A.; ROHLIN, M. Assessment of the trabecular pattern before endosseous implant treatment: diagnostic outcome of periapical radiography in the mandible. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, Saint Louis, v. 82, n. 3, p. 335-43, Sep. 1996.
45. MAAHS, M, A. P. **Associação entre o uso de bifosfonatos e osteonecrose dos maxilares:** Estudo em ratos. Tese (Doutorado em Odontologia) – Pós-

Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

46. MAHL, C. R. W.; TONIETTO, A.; GIORGI, B. G.; GIROTTO, C. V.; FONTANELLA, V. R. C. Evaluation of radiographic density and proportion of trabecular bone in the femur of female rats medicated with glucocorticoid and bifosfonato. **Rev odonto ciênc**, Porto Alegre, v. 24, n. 1, p. 28-31. Jan.-Mar. 2009.
47. MARZOUK, K. M.; GAMAL, A. Y.; AL-AWADY, A. A.; SHARAWY, M. M. Osteoconductive effects of vinyl styrene microbeads in rat calvarial defects. **J Oral Maxillofac Surg**, Filadélfia, v. 65, n. 8, p. 1508-16, Aug. 2007.
48. MCCLUNG, M. R: Bisphosphonates. **Endocrinol Metab Clin North Am**, Filadelfia, v. 32, n. 1, p. 253-71, Mar. 2003.
49. MCDOWELL, H.; GREGORY, T. M.; BROWN, W. E. Solubility of $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ in the system $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ at 5, 15, 25, and 37°C. **J Res Natl Bur Stand**, Washington, v. 81A, n. 2 e 3, p. 273–281, Mar./Jun. 1977.
50. MENEZES, A. M.; ROCHA, F. A.; CHAVES, H. V.; CARVALHO, C. B.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. Effect of sodium alendronate on alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, Chicago, v. 76, n. 11, p. 1901-9, Nov. 2005.
51. MERAW, S. J.; REEVE, C. M.; WOLLAN, P. C. Use of alendronate in periimplant defect regeneration. **J Periodontol**, Chicago, v. 70, n. 2, p. 151-8, Feb. 1999.
52. MERKX, M. A.; MALTHA, J. C.; STOELINGA, P. J. Assessment of the value of anorganic bone additives in sinus floor augmentation: a review of clinical reports. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Copenhagen, v. 32, n. 1, p. 1-6, Feb. 2003.
53. MÖLLER, 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**, Berlim, v. 18, n. 9, p. 2203-11, Dec. 2014.
54. MÜLLER, R. Bone microarchitecture assessment: current and future trends. **Osteoporos Int**, Londres, v. 14 (suppl 5), p. S89-99, Aug. 2003.
55. MÜLLER, R.; VAN CAMPENHOUT, H.; VAN DAMME, B.; VAN DER PERRE, G.; DEQUEKER, J.; HILDEBRAND, T.; RÜEGSEGG, P. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and microcomputed tomography. **Bone**, Nova Iorque, v. 23, n. 1, p. 59-66, Jul. 1998.
56. MUSSO, D. B. **Uso tópico do alendronato de sódio associado ao Bio-Oss® no reparo de defeitos ósseos** - Estudo histomorfométrico em calvária de ratos. 2015. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Pós-Graduação em Clínica Odontológica, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2015.

57. OHASHI, T., MATSUNAGA, S., NAKAHARA, K., ABE, S., IDE, Y., TAMATSU, Y., TAKANO, N. Biomechanical role of peri-implant trabecular structures during vertical loading. **Clin Oral Investig**, Berlim, v. 14, n. 5, p. 507-13, Oct. 2010.
58. OZAN, O.; TURKYILMAZ, I.; YILMAZ, B. A preliminary report of patients treated with early loaded implants using computerized tomography guided surgical stents: flapless versus conventional flapped surgery. **J Oral Rehabil**, Oxford, v. 34, n. 11, p. 835-40, Nov. 2007.
59. PAPAPOULOS, S. E. Bone diseases: Bisphosphonates in osteoporosis—beyond 5 years. **Nature Reviews Rheumatology**, Nova Iorque, v. 9, n. 5, p. 263-4, May. 2013.
60. PARFITT, A. M.; DREZNER, M. K.; GLORIEUX, F. H.; KANIS, J. A.; MALLUCHE, H.; MEUNIER, P. J.; OTT, S. M.; RECKER, R. R. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. Report of the ASBMR histomorphometry nomenclature committee. **J Bone Miner Res**, Washington, v. 2, n. 6, p. 595-610, Dec. 1987.
61. PARSA, A.; IBRAHIM, N.; HASSAN, B.; VAN DER STELT, P.; WISMEIJER, D. Bone quality evaluation at dental implant site using multislice CT, micro-CT, and cone beam CT. **Clin Oral Implants Res**, Copenhagen, v. 26, n. 1, p. e1-7, 2015.
62. PETTINICCHIO, M.; TRAINI, T.; MURMURA, G.; CAPUTI, S.; DEGIDI, M.; MANGANO, C.; PIATTELLI, A. Histologic and histomorphometric results of three bone graft substitutes after sinus augmentation in humans. **Clin Oral Investig**, Berlim, v. 16, n. 1, p. 45-53, Feb. 2012.
63. RIBEIRO-ROTTA, R. F.; LINDH, C.; PEREIRA, A. C.; ROHLIN, M. Ambiguity in bone tissue characteristics as presented in studies on dental implant planning and placement: a systematic review. **Clin Oral Implants Res**, Copenhagen, v. 22, n. 8, p. 789-801, Aug. 2011.
64. ROCHA, S. M. W. **Análise do reparo ósseo com alendronato de sódio associado ao osso bovino liofilizado (Bio-Oss®):** Estudo radiomicrográfico em calvária de coelhos. 2013. Tese (Doutorado em Odontologia) - Programa Integrado de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2013.
65. ROGERS, M. J.; GORDON, S.; BENFORD, H. L.; COXON, F. P.; LUCKMAN, S. P.; MONKKONEN, J.; FRITH, J. C. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Cancer**, Washington, v. 15, n. 88, p. 2961-78, Jun. 2000.
66. RUSSELL, R. G. G. Bisphosphonates: The first 40 years. **Bone**, Nova Iorque, v. 49, n. 1, p. 2-19, Jul. 2011.
67. RUSSELL, R. G.; WATTS, N. B.; EBETINO, F. H.; ROGERS, M. J. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. **Osteoporos Int**, Londres, v. 19, n. 6, p. 733-59, Jun. 2008.

68. SAKKA, S.; COULTHARD, P. Bone quality: a reality for the process of osseointegration. *Implant Dent*, Baltimore, v. 18, n. 6, p. 480-5, Dec. 2009.
69. SCHLEGEL, A. K.; DONATH, K. Bio-Oss a resorbable bone substitute? *J Long Term Eff Med Implants*, **Nova lorque**, v. 8 n. 3-4, p. 201-9, 1998.
70. SCHMITT, C. M.; DOERING, H.; SCHMIDT, T.; LUTZ, R.; NEUKAM, F. W.; SCHLEGEL, K. A. Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann® BoneCeramic, Bio-Oss®, Puros®, and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res*, Copenhagen, v. 24, n. 5, p. 576-85, May. 2013.
71. SCHMITT, C. M.; MOEST, T.; LUTZ, R.; NEUKAM, F. W.; SCHLEGEL, K. A. Anorganic bovine bone (ABB) vs. autologous bone (AB) plus ABB in maxillary sinus grafting. A prospective non-randomized clinical and histomorphometrical trial. **Clin Oral Implants Res**, Copenhagen, v. 26, n. 9, p. 1043-50, Sep. 2015.
72. SCHULZE, R.; HELI, U.; GROSS, D.; BRUELLMANN, D. D.; DRANICSHNIKOW, E.; SCHWANECKE, U.; SCHOEMER, E. Artifacts in CBCT: a review. *Dentomaxillofac Radiol*, Erlangen, v. 40, n. 5, p. 265-73, Jul. 2011.
73. SEO, S. W.; CHO, S. K.; STORER, S. K.; LEE, F. Y. Zoledronate reduces unwanted bone resorption in intercalary bone allografts. **Int Orthop**, Berlin, v. 34, n. 4, p. 599-603, Apr. 2010.
74. SHARMA, A.; PRADEEP, A. R. Clinical efficacy of 1% alendronate gel in adjunct to mechanotherapy in the treatment of aggressive periodontitis: a randomized controlled clinical trial. **J Periodontol**, Chicago, v. 83, n.1, p. 19-26, 2012a.
75. SHARMA, A.; PRADEEP, A. R. Clinical Efficacy of 1% Alendronate Gel as a Local Drug Delivery System in the Treatment of Chronic Periodontitis: A Randomized, Controlled Clinical Trial. **J Periodontol**, Chicago, v. 83, n. 1, p.11-18, 2012b.
76. SOARDI, C. M.; CLOZZA, E.; TURCO, G.; BIASOTTO, M.; ENGBRETSON, S. P.; WANG, H. L.; ZAFFE, D. Microradiography and microcomputed tomography comparative analysis in human bone cores harvested after maxillary sinus augmentation: a pilot study. *Clin Oral Implants Res*, Copenhagen, v. 25, n. 10, p. 1161-8, Oct. 2014.
77. SRISUBUT, S.; TEERAKAPONG, A.; VATTRAPHODES, T.; TAWEECHASUPAPONG, 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**, St. Louis, v. 104, n. 4, p. 11-16, Oct. 2007.
78. TENENBAUM, H. C.; SHELEMAY, A.; GIRARD, B.; ZOHAR, R.; FRITZ, P. C. Bisphosphonates and periodontics: potential applications for regulation of bone mass in the periodontium and other therapeutic/diagnostic uses. **J Periodontol**, Chicago, v. 73, n. 7, p. 813-22, Jul. 2002.

79. TERKELTAUB, R. A. Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. **Am J Physiol Cell Physiol**, Bethesda, v. 281, n. 1, p. C1–C11, Jul. 2001.
80. 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**, Nova Iorque, v. 114, n. 5, p. S146-52, Nov. 2012.
81. TRAINI, T.; VALENTINI, P.; IEZZI, G.; PIATTELLI, A. A histologic and histomorphometric evaluation of anorganic bovine bone retrieved 9 years after a sinus augmentation procedure. **J Periodontol**, Chicago, v. 78, n. 5, p. 955-61, May. 2007.
82. ULRICH, D.; VAN RIETBERGEN, B.; LAIB, A.; RÜEGSEGGER, P. The ability of three-dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone. *Bone*, Nova Iorque, v. 25, n. 1, p. 55-60, Jul. 1999.
83. VANDEWEGHE, S.; COELHO, P. G.; VANHOVE, C.; WENNERBERG, A.; JIMBO, R. Utilizing micro-computed tomography to evaluate bone structure surrounding dental implants: A comparison with histomorphometry. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, Hoboken, v. 101, n. 7, p. 1259-66, Oct. 2013.
84. WALLACE, S.S.; FROUM, S. J.; TARNOW, D. P. Histologic evaluation of sinus elevation procedure: a clinical report. **Int J Periodontics Restorative Dent**, Chicago, v. 16, n. 1, p. 46-51, Feb. 1996.
85. WOZNEY, J. M. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. **Mol Reprod Dev**, Nova Iorque, v. 32, n. 2, p. 160-7, Jun. 1992.
86. YAFFE, A.; BINDERMAN, I.; BREUER, E.; PINTO, T.; GOLOMB, G. Disposition of alendronate following local delivery in a rat jaw. **J Periodontol**, Chicago, v. 70, n. 8, p. 893-5, Aug. 1999.
87. YAFFE, A.; FINE, N.; ALT, I.; BINDERMAN, I. The effect of bisphosphonate on alveolar bone resorption following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. **J Periodontol**, Chicago, v. 66, n. 11, p. 999-1003, Nov. 1995.
88. YIP, G.; SCHNEIDER, P.; ROBERTS, E. W. Micro-computed tomography: high resolution imaging of bone and implants in three dimensions. **Semin Orthod**, Filadélfia, v. 10, n. 2, p. 174–87, Jun. 2004.
89. VERKET, A.; LYGSTADAAS, S. P.; RASMUSSEN, L.; HAANÆS, H. R.; WALLSTRÖM, M.; WALL, G.; WOHLFAHRT, J. C. Maxillary Sinus Augmentation with Porous Titanium Granules: A Microcomputed Tomography and Histologic Evaluation of Human Biopsy Specimens. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v. 28, n. 3, p. 721–8, May.-Jun. 2013.
90. PAULUS, M. J., GLEASON, S. S., KENNEL, S. J., HUNSICKER, P. R., JOHSON, D. K. High Resolution X-ray Computed Tomography: An Emerging Tool for Small Animal Cancer Research. **Neoplasia**, v. 2, p. 62-70, 2000.

91. MARTINS, S. C.; MELLO, J.; MARTINS, C. C.; MAURÍCIO, A.; GINJEIRA, A. Comparação da obturação endodôntica pelas técnicas de condensação lateral, híbrida de Tagger e Thermafil: estudo piloto com Micro-tomografia computadorizada. **Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac**, v. 52, n. 2, p. 59-69, 2011.
92. QUEIROZ, A. C. F. S. **Estudo comparativo de defeitos dentinários provocados por diferentes sistemas de prepare do canal radicular**. 2014. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia Prof. Albino Coibra Filho da Universidade de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, 2014.

ANEXOS

ANEXO A - Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFES - Protocolo nº 10/2014.



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



CERTIFICADO

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



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

Vitória (ES), 06 de junho de 2014.

ANEXOS

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

Bauru, 29 de julho de 2014.

Dra. Natália M. Weigert

Descrição da formulação:

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

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

Pharmácia Specifica Ltda. ME
Rua Gustavo Maciel 14-65 - Bauru-SP
CNPJ 52.791.548-0001/09

Farmacêutica Responsável:
Paula Renata AP. Nigro Rivera Carazzatto
CRF-9580-SP