

Estudo da Reparação Óssea na Mandíbula de Coelhos Sob a Ação do Alendronato Sódico e da sua Associação com a Hidroxiapatita

Raquel Guedes FERNANDES^a, Horácio FAIG-LEITE^b, Yasmin Rodarte CARVALHO^b

^aDoutoranda em Biopatologia Bucal, Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia, UNESP
12245-000 São José dos Campos - SP

Disciplina de Anatomia, Faculdade de Pindamonhangaba, FAPI
12422-970 Pindamonhangaba - SP

^bDepartamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia, UNESP
12245-000 São José dos Campos - SP

Fernandes RG, Faig-Leite H, Carvalho YR. Study of bone repair in the mandible of rabbits under the action of sodium alendronate and its association with hydroxyapatite. Rev Odontol UNESP. 2004; 33 (3): 123-30.

Resumo: Avaliou-se a ação do alendronato sódico e da sua associação com hidroxiapatita pura granular (HA) na reparação de defeitos na cortical óssea externa do corpo da mandíbula de 27 coelhos adultos. Os animais foram divididos em três grupos: controle, alendronato e alendronato/HA. Os animais medicados receberam 1 mg/kg/dia de alendronato sódico por via oral, durante 10 dias consecutivos após a cirurgia, e os do Grupo alendronato/HA tiveram o defeito ósseo preenchido com a HA. Os sacrifícios ocorreram 14, 21 e 28 dias após a cirurgia. Histologicamente, em 14 dias ocorreu uma neoformação óssea a partir do perióstio e do endóstio que fechava o defeito em extensão, mas não em profundidade. Foram observadas trabéculas ósseas imaturas circundadas por osteoblastos, núcleos de ossificação e grandes espaços medulares preenchidos por tecido conjuntivo celularizado. Em 21 e 28 dias, eram notados maturação das trabéculas e progressivo remodelamento ósseo. No grupo que recebeu a HA, as partículas permaneceram dentro do defeito interpostas às trabéculas ósseas. Estatisticamente, não houve diferenças entre os tratamentos ($p > 0,05$), somente entre os períodos de observação ($p = 0,000$). Concluiu-se que o uso do alendronato sódico e da sua associação com a HA não interferiu na reparação óssea no modelo experimental.

Palavras-chave: *Regeneração óssea; alendronato; hidroxiapatita.*

Abstract: This work evaluated the action of sodium alendronate and your association with granular pure hydroxyapatite in the repair of bone defects in the external cortical surface of the mandible body in twenty-seven adult rabbits. The animals were divided into three groups: a control, alendronate and a group alendronate/hydroxyapatite. The treated animals received sodium alendronate administrated orally, 1mg/kg/day, for 10 consecutive days after surgery and in the alendronate/hydroxyapatite group, the bone defect was full with hydroxyapatite. The animals were sacrificed at 14, 21, and 28 days after surgery. Histologically, as early as 14 days, bone neoformation occurred from periosteum and endosteum, which closed the defect in extension but not in depth. It was observed immature bone trabeculae surrounded by osteoblasts, ossification nuclei, and large medullar spaces filled with cellularized connective tissue. At 21 and 28 days, it was noticed the maturation of the trabeculae with progressive remodeling and reduction of medullar spaces. In the group treated with hydroxyapatite, particles remained inside the defect interposed to the bone trabeculae. Statistically, there were no differences in the treatments ($p > 0.05$), only in the observation periods ($p = 0,000$). It was concluded that the administration of sodium alendronate and your association with hydroxyapatite did not favor bone repair in this experimental model.

Keywords: *Bone regeneration; alendronate; hydroxyapatite.*

Introdução

Vários estudos^{2,3,6,8,9,24} e pesquisas vêm sendo realizados a fim de proporcionar melhora no processo de reparação de defeitos ósseos ou perdas de tecido ósseo, buscando materiais que, ao serem implantados nestes locais, colaborem e favoreçam à neoformação óssea, como os enxertos aloplásticos, que são materiais sintéticos denominados de materiais de implante². Entre os vários materiais aloplásticos, a HA tem recebido grande atenção devido à sua capacidade de integração ao leito receptor, à sua biocompatibilidade¹⁸ e por sua reconhecida propriedade de osteocondução⁴.

Devido às características acima mencionadas, a HA tem sido largamente utilizada na Odontologia como um material de implante, como, por exemplo, no tratamento de defeitos ósseos periodontais¹¹, no aumento de rebordos alveolares⁵ ou em cirurgias ortognáticas para a correção de deformidades maxilofaciais⁶.

Os bisfosfonatos são drogas químicas que se ligam fortemente ao tecido ósseo, além de apresentarem a capacidade de inibir a reabsorção óssea, cujo principal mecanismo de ação está relacionado à diminuição da atividade osteoclástica^{14,21,28}. O alendronato sódico, sendo um bisfosfonato de terceira geração⁷, apresenta como uma de suas características uma maior potência de ação quando comparado aos bisfosfonatos das gerações anteriores. Uma das principais indicações do uso do alendronato sódico, bem como dos bisfosfonatos de maneira geral, é no tratamento de doenças como a osteoporose^{16,17,20,21,27}, na osteólise induzida por tumores, na hipercalemia e na doença de Paget¹⁶. O alendronato sódico apresenta como uma de suas propriedades químicas a redução da perda de tecido ósseo, fato este que ocorre em doenças caracterizadas pela elevada ação dos osteoclastos ou por um desequilíbrio na relação osteoblasto-osteoclasto¹⁶.

Alguns trabalhos encontrados na literatura relatam que o alendronato, como os demais bisfosfonatos, ligam-se fortemente aos cristais de HA do osso, especialmente nos pontos de ativo remodelamento ósseo^{21,25}.

Em decorrência do acima descrito, julgou-se pertinente estudar a ação dos bisfosfonatos, especificamente do alendronato e da sua associação com a HA, no processo de reparação do tecido ósseo.

Material e método

Nesta pesquisa foram utilizados 27 coelhos *New Zealand*, machos e fêmeas, pesando em média quatro quilos, que foram submetidos a uma cirurgia para a confecção do defeito ósseo e divididos em três grupos constituídos por nove animais em cada grupo. No grupo controle (C), os coelhos não receberam tratamento algum. No grupo alendronato (A), os animais foram medicados com alendronato sódico e, no terceiro grupo, os animais foram medicados com alendronato sódico e tiveram os defeitos ósseos completamente preenchidos por HA

pura granular sintética, sintetizada pelo Instituto de Química de Piracicaba – UNICAMP. Este grupo foi denominado alendronato/HA (A/HA). Os grupos C, A e A/HA foram divididos em três subgrupos constituídos por três animais, que foram sacrificados nos períodos de 14, 21 e 28 dias após a cirurgia, por meio de dose excessiva de anestésico.

Os animais foram anestesiados com uma solução aquosa de 2% de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompun - Bayer do Brasil) e ketamina base (Francotar - Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda.), respectivamente na dosagem de 0,85 ml e 1,2 ml para 3,4 kg, por via intramuscular. Após a indução anestésica, realizava-se a tricotomia, a assepsia da pele e uma incisão, medindo aproximadamente 2,5 cm de comprimento, na pele da região masseterica, a fim de expor os tecidos moles subjacentes. Tais tecidos foram divulsionados e afastados para a obtenção do acesso à superfície óssea da face lateral do corpo da mandíbula.

O defeito ósseo monocortical foi realizado na tábua óssea externa do corpo da mandíbula, próximo da base, utilizando-se uma broca trefina, medindo 4,25 mm de diâmetro, sob abundante irrigação com soro fisiológico (NaCl 0,9%). Por fim, os tecidos moles foram reposicionados e suturados com fio reabsorvível e a pele foi suturada com pontos simples utilizando fio de seda. Após o término do procedimento cirúrgico, todos os animais foram medicados com antiinflamatório (diclofenaco sódico 75 mg – Voltaren – Geigy) e antibiótico (associação de benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina potássica, diidroestreptomicina base sulfato-Pentabiotico veterinário – Fort Dodge), na dosagem de 0,6 ml/3,4 Kg, por via intramuscular.

Os animais dos grupos A e A/HA foram medicados com alendronato sódico (Endronax 10 mg - Sintofarma), na dosagem de 1 mg/kg/dia, por via oral, durante dez dias consecutivos, sendo o tratamento iniciado no dia seguinte ao da cirurgia. A diluição do medicamento para posterior administração foi realizada por meio da trituração do comprimido (10 mg) diluído em 10 ml de água.

Decorridos os períodos de observação, os animais foram sacrificados por meio de dose excessiva de anestésico. As peças ósseas foram removidas, limpas e fixadas em formol a 10%. Posteriormente, as peças foram descalcificadas em solução de ácido fórmico a 60% e hemi-seccionadas transversalmente na região central do defeito em dois fragmentos. Cada fragmento foi incluído em um bloco de parafina e, de cada um dos blocos, foram obtidos 12 cortes semi-seriados (5 µm de espessura e 15 µm entre cada nível), que foram corados com Hematoxilina e Eosina para a realização da análise qualitativa do processo de reparação óssea. Para a análise histomorfométrica, foram selecionadas três lâminas (de cada animal), sendo sempre a primeira (região mais central do defeito), a sexta e a décima primeira (região mais periférica). A análise foi realizada pelo método estereológico²⁷,

e os dados obtidos foram submetidos à estatística descritiva e à análise de variância (ANOVA) utilizando como nível de significância a margem de erro de 5%.

Resultado

Os padrões histológicos encontrados nos Grupos C, A, A/HA foram semelhantes entre si, apresentando variações mais marcantes em relação ao período de observação. No período de 14 dias, todos os grupos apresentaram na área do defeito ósseo uma neoformação óssea arranjada em delicadas trabéculas ósseas imaturas circundadas por inúmeros osteoblastos grandes e volumosos. No interior das trabéculas, havia osteócitos volumosos em grande quantidade localizados dentro de amplas lacunas. Entre as trabéculas, observava-se a presença de amplos espaços medulares preenchidos por tecido conjuntivo frouxo ou por tecido conjuntivo ricamente celularizado com aspecto osteogênico (Figura 1). No Grupo A, a neoformação óssea foi mais discreta quando comparada à do Grupo C e do Grupo A/HA, demonstrando espaços medulares mais amplos e trabéculas ósseas neoformadas mais imaturas, sem indicações de remodelamento (Figura 2). No Grupo A/HÁ, foi possível constatar a presença das partículas de HA de diferentes tamanhos e variadas formas interpostas entre as trabéculas ósseas, entre o tecido conjuntivo e entre os espaços medulares (Figura 3).

No período de 21 dias, observou-se uma maturação das estruturas histológicas quando comparadas às dos respectivos grupos no período de 14 dias. A cortical óssea externa já estava formada, fechando o defeito ósseo em extensão a partir da superfície de corte pelo periósteo e pelo endósteo. Constatou-se locais de remodelamento ósseo, evidenciando um arranjo estrutural semelhante ao lamelar. Os osteócitos presentes nas trabéculas estavam mais achatados, e as la-

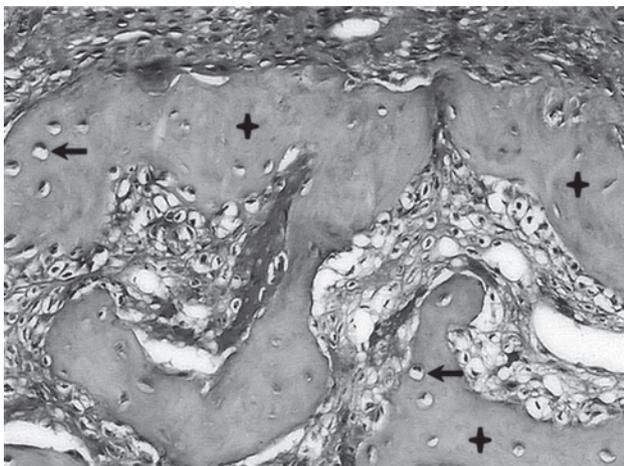


Figura 1. Grupo controle (14 dias). Trabéculas ósseas imaturas (+), com a presença de osteócitos volumosos localizados em amplas lacunas (←). HE. 100X.

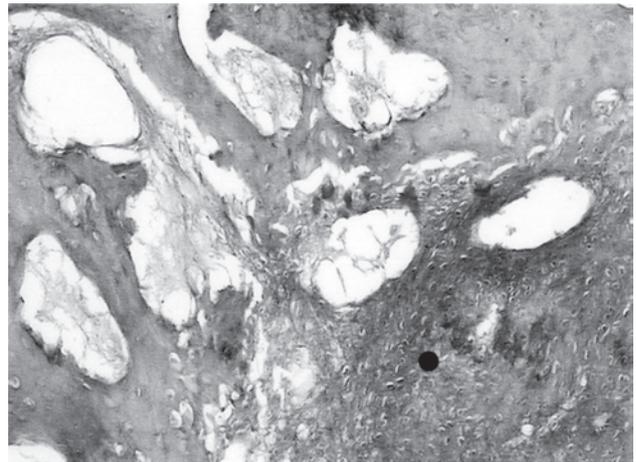


Figura 2. Grupo medicado (14 dias). Tecido conjuntivo celularizado com aspecto osteogênico (●). HE. 100X.

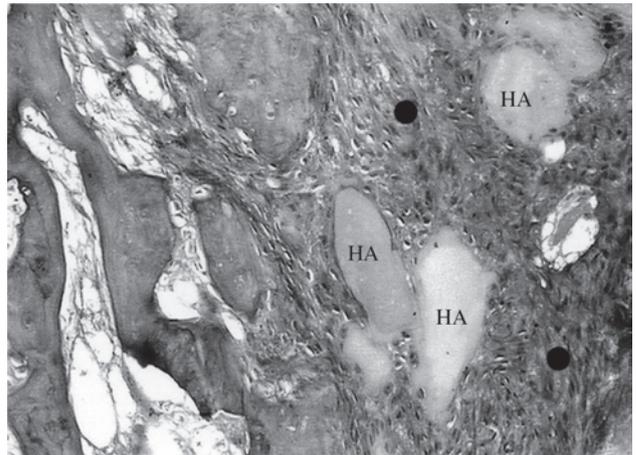


Figura 3. Grupo medicado/hidroxiapatita (14 dias). Partículas de hidroxiapatita (HA), circundadas por tecido conjuntivo celularizado com aspecto osteogênico (●). HE. 100X.

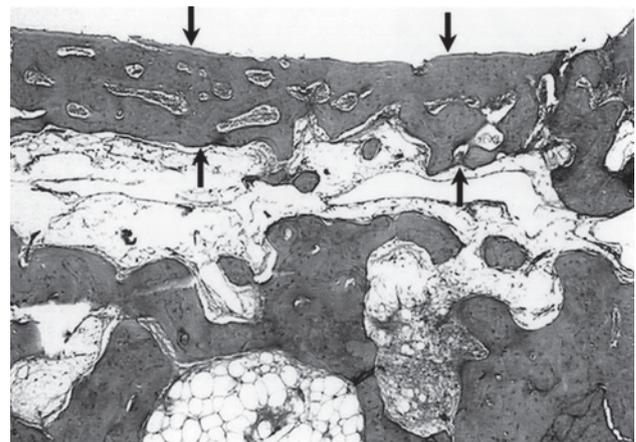


Figura 4. Grupo controle (21 dias). Cortical óssea mais espessa e bem organizada estruturalmente (←). HE. 25X.

cunas nas quais se encontravam eram menores (Figura 4). No Grupo A/HA, pôde-se ainda observar que as partículas de HA estavam circundadas por tecido ósseo neoformado, bem como circundadas por grande quantidade de tecido conjuntivo de aspecto osteogênico, e estavam em íntimo contato com o osso neoformado (Figura 5).

Os defeitos ósseos dos grupos experimentais no período de 28 dias estavam fechados em extensão por meio de uma cortical óssea mais uniforme e regular. Na espessura do defeito ósseo, encontrava-se uma maior quantidade de osso neoformado, constituído por trabéculas ósseas maiores que se uniam umas às outras demonstrando, desta forma, intensa formação óssea (Figura 6). Tais trabéculas exibiam intensa remodelação óssea nesse período, fato este justificado pela grande quantidade de linhas reversas. Também se observava um arranjo ósseo lamelar bastante evidente,

com osteócitos mais achatados e espaços medulares com dimensões bem menores (Figura 7). No Grupo A/HA, havia um menor número de partículas de HA, e estas estavam em íntimo contato com o osso neoformado e sem a presença de tecido interposto na interface partícula/osso neoformado, apresentando, ainda, considerável número de linhas reversas de remodelação (Figura 8).

A análise estatística dos dados obtidos pela análise histomorfométrica mostrou que, em relação às formas de tratamento, não houve diferenças entre os grupos. Quanto aos períodos de observação, notou-se que houve um aumento dos valores das médias em relação aos três períodos, mostrando que provavelmente tenha ocorrido uma formação óssea progressiva, independentemente do tratamento realizado.

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados estatísticos com relação à interação entre as diferentes formas de

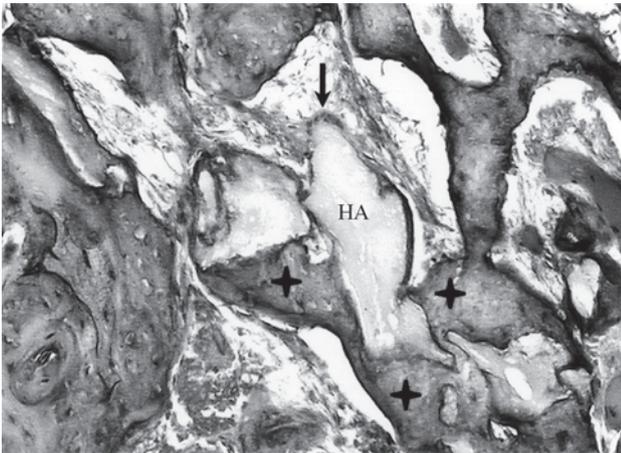


Figura 5. Grupo medicado/hidroxiapatita (21 dias). Partícula de hidroxiapatita (HA), apresentando uma célula gigante na sua periferia (←) e circundada por tecido ósseo neoformado (+). HE. 100X.

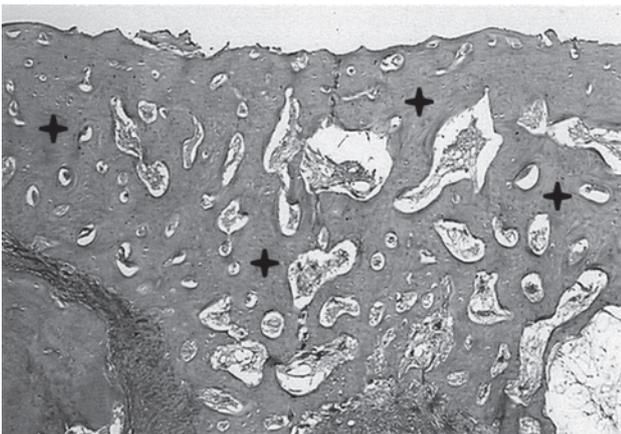


Figura 6. Grupo controle (28 dias). Cortical óssea exibindo grande quantidade de osso neoformado (+). HE. 100X.

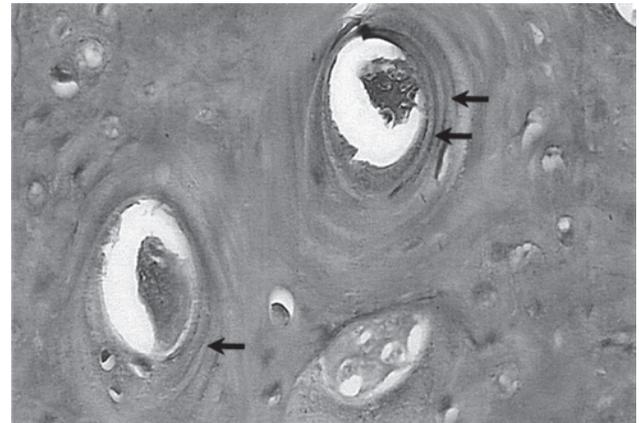


Figura 7. Grupo controle (28 dias). Arranjo ósseo lamelar bastante evidente (←). HE. 200X.

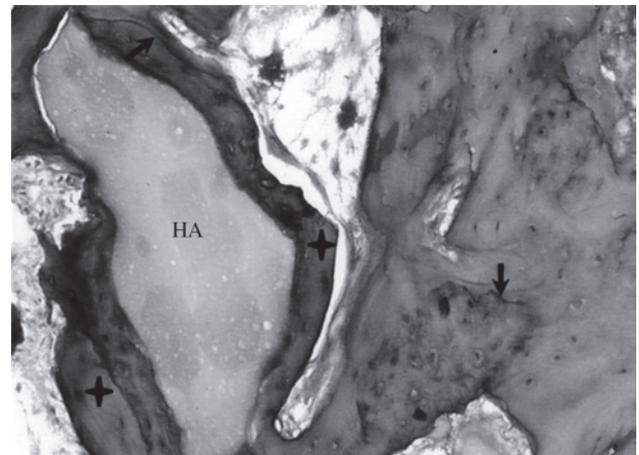


Figura 8. Grupo medicado/hidroxiapatita (28 dias). Partícula de hidroxiapatita (HA), circundada por tecido ósseo (+); presença de linhas reversas de remodelação (←). Notar a interface osso/HA sem interposição de tecido conjuntivo. HE. 100X.

tratamento e os períodos de observação.

Considerando-se os dados descritos na Tabela 1 podemos afirmar que não houve interação estatisticamente significativa entre as diferentes formas de tratamento e os períodos de observação estudados.

Na Tabela 2 encontramos os resultados da análise de variância (ANOVA), na qual estão apresentados todos os fatores estudados.

Pelos resultados da análise de variância, encontrados na Tabela 2, observamos que houve diferença estatisticamente significativa, quando foram analisados os diferentes períodos de observação realizados neste trabalho. Em relação às diferentes formas de tratamento e à sua interação com os períodos de observação, não foram encontrados resultados estatisticamente significantes.

Uma vez que a análise de variância a dois fatores acusou diferenças estatisticamente significantes em relação ao período de observação, foi realizado o teste de Tukey para comparação entre os diferentes períodos de observação estudados.

Analisando a Tabela 3, constatamos que as médias dos três períodos de observação estudados apresentaram diferenças estatisticamente significantes.

Discussão

Atualmente, medicamentos como os bisfosfonatos têm

Tabela 1. Estatística descritiva referente à interação entre as diferentes formas de tratamento e os períodos de observação

Interação tratamento X tempo	Média	DP
C-14 dias	0,3240	0,07380
C-21 dias	0,5097	0,08310
C-28 dias	0,5967	0,04900
M-14 dias	0,2517	0,05970
M-21 dias	0,4087	0,10990
M-28 dias	0,5623	0,08180
M/HA-14 dias	0,3683	0,05260
M/HA-21 dias	0,4120	0,01709
M/HA-28 dias	0,4547	0,05210

DP: desvio padrão

Tabela 2. Análise de variância a dois fatores estudados

Fatores estudados	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Razão F	P
Tempo	2	0,22599	0,11300	23,74	0,0000*
Tratamento	2	0,02714	0,01357	2,850	0,0840
Interação	4	0,04635	0,01159	2,430	0,0848
Resíduo	18	0,08566	0,00476		
Total	26	0,38515			

*p < 0,05 - diferença estatisticamente significante

sido amplamente utilizados, devido ao fato de se ligarem fortemente ao tecido ósseo, apresentarem a capacidade de inibir a reabsorção óssea^{14,21,28}, aumentar a densidade óssea^{16,22,25} e diminuir o risco de fraturas ósseas²⁰. Os bisfosfonatos agem diretamente sobre os osteoclastos, diminuindo sua atividade, causando apoptose dessas células, bem como atuam indiretamente sobre os osteoblastos, que passam a produzir um inibidor do recrutamento dos osteoclastos; este mecanismo de ação ainda não perfeitamente esclarecido^{14,23,28}.

Reddy et al.²² (1995), utilizando o alendronato sódico por via oral no tratamento de doenças periodontais em cães, notaram uma diminuição da mobilidade dentária e um aumento significativo da densidade da massa óssea dos animais medicados quando comparados aos do grupo controle (não medicado). Já Fayad¹⁰ (2001) avaliou o processo de reparação óssea em mandíbulas de ratos, usando dois tipos de bisfosfonatos, sendo um deles o alendronato sódico. Entretanto, nenhum dos bisfosfonatos utilizados estimularam a reparação óssea.

Silva²⁶ (2000) avaliou a ação do alendronato sódico na reparação óssea na tíbia de ratas ovariectomizadas, administrado, por via oral, nas doses de 0,25 mg/Kg, 0,5 mg/Kg e 0,75 mg/kg diariamente. A análise histológica das tíbias revelou uma deposição óssea mais marcante nos grupos tratados com doses mais elevadas de alendronato sódico, motivo pelo qual optamos por analisar o efeito do alendronato na dosagem de 1 mg/kg/dia. Nossa análise histológica qualitativa revelou que a neoformação óssea na presença do alendronato foi menor quando comparada à que ocorreu no grupo controle. Observamos ainda que, nos grupos tratados com alendronato, o osso neoformado era constituído por delgadas trabéculas ósseas, com discreta indicação de remodelamento.

Os trabalhos que discorrem sobre a ação do alendronato

Tabela 3. Teste de Tukey para comparação entre os diferentes períodos de observação estudados

Períodos de observação	Média
14 dias	0,3147*
21 dias	0,4434*
28 dias	0,5379*

*diferença estatisticamente significante

sódico encontrados na literatura mostram que esse medicamento está relacionado principalmente com o aumento da densidade óssea e com a redução da reabsorção óssea^{16,22}. Contudo, poucos são os trabalhos que relatam realmente a ação do alendronato sódico como agente formador de tecido ósseo. Esta nossa afirmação encontra respaldo no trabalho de Manolagas¹⁷ (2000), que afirmou ser o alendronato um potente inibidor da reabsorção óssea, pois esse medicamento desencadeia a diminuição de células progenitoras de osteoclastos, a diminuição do recrutamento dos osteoclastos, bem como a promoção de apoptose dos osteoclastos maduros reduzindo, assim, a velocidade da reabsorção e do remodelamento ósseo. Além disso, o autor descreveu que o tratamento a longo prazo com essas drogas tem demonstrado uma elevação no número e na atividade de osteoblastos, elevando também a possibilidade de os bisfosfonatos não só reduziram a reabsorção óssea, como também virem a ter um efeito positivo na formação de osso.

Em decorrência do fato dos bisfosfonatos, de modo geral, apresentarem uma afinidade pelos cristais de HA do osso²⁵, avaliamos a ação do alendronato sódico associado ao material de enxerto de HA sintética do tipo granular, pois são escassos, na literatura os trabalhos que mostrem esse tipo de associação e que relatem os resultados decorrentes dela.

Denissen et al.⁹ (2000) desenvolveram uma metodologia, que visava a associação de implantes de HA porosa ao bisfosfonato, obtendo, desta maneira, um complexo por eles denominado de implante HA/bisfosfonato. Esses implantes foram colocados em tíbias de ratos. Os resultados histológicos mostraram que todos os implantes de HA/bisfosfonato estavam completamente integrados ao tecido ósseo. Os autores afirmam também que, devido a esse complexo, os implantes apresentaram capacidade de osteocondução para o osso da tibia, o qual se neoformou ao redor e no interior da estrutura porosa dos implantes. Utilizando a mesma metodologia⁹, esse complexo HA/bisfosfonato foi implantado em alvéolos de cabras e comparado a implantes de HA pura⁸. O complexo HA/bisfosfonato apresentou uma maior integração ao osso alveolar e um maior potencial osteocondutor em relação ao implante de HA pura.

Com relação à associação do alendronato sódico com a HA, os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significantes. Entretanto, quando analisamos a neoformação óssea ocorrida nos Grupos A/HA e A, fica claro que os elementos constituintes do tecido ósseo do Grupo A/HA apresentaram uma maior maturação e remodelação nos diferentes períodos de observação quando comparados aos respectivos períodos do Grupo A.

Pela análise histológica do Grupo A/HA, foi possível observar que os grânulos de HA implantados nos defeitos entraram em íntimo contato com o osso que se formava, estabelecendo uma interface osso/HA sem a interposição de tecido conjuntivo, como também descreveu Caria³ (1999).

Porém, outros experimentos realizados com a utilização da HA apresentaram tecido conjuntivo interposto na interface implante/osso^{1,19}.

Observando as partículas de HA presentes no interior dos defeitos ósseos realizados em nosso estudo, notamos que elas apresentavam dimensões e formas variadas. Entretanto, a maioria dessas partículas, independentemente da sua forma e do seu tamanho, encontrava-se em íntimo contato com as estruturas ósseas neoformadas. Semelhante resultado foi obtido por Lehtinen et al.¹⁵ (1990) que, analisando o comportamento de quatro HAS, cujas partículas possuíam diferentes formas e tamanhos, não encontraram diferenças no padrão da reparação óssea entre as várias HAS utilizadas.

A respeito da HA por nós utilizada, essa se mostrou biocompatível, uma vez que não observamos nenhum tipo de resposta inflamatória decorrente da implantação desse material, nos períodos estudados. Essa nossa constatação é a mesma obtida por autores como Higashi e Okamoto¹³ (1996) e Caria³ (1999). Já outros autores afirmaram que as HAS provocam uma reação inflamatória do tipo corpo estranho^{18,24}.

Sobre o tamanho do defeito ósseo realizado no corpo da mandíbula dos animais (4,5 mm de diâmetro), temos a considerar que esse defeito foi considerado como crítico baseado no conceito proposto por Gosain et al.¹² (2000), que afirmam que defeito crítico refere-se ao tamanho de um defeito que não cicatriza durante o período de estudo, sendo que a cicatrização ocorreria se o defeito não somente fechasse em extensão, mas também houvesse formação óssea em toda a profundidade do defeito, ou seja, em todo o seu volume. Esta afirmação se justifica, devido ao fato dos estudos experimentais serem realizados durante um intervalo de tempo limitado, não se estendendo por toda a vida do animal.

Em nosso trabalho, não houve reparo total da área onde foi confeccionado o defeito. Podemos fazer tal afirmação, uma vez que nos animais sacrificados após 28 dias, na área do defeito não foi encontrado o mesmo padrão histológico que o presente na cortical óssea adjacente ao defeito ósseo. Neste local observou-se uma neoformação óssea unindo as margens do defeito criado, porém estas estruturas ainda apresentavam intensa atividade de neoformação e de remodelação óssea.

Após a realização deste trabalho, verificamos a grande necessidade de mais estudos sobre a ação dos bisfosfonatos, em especial do alendronato sódico, uma vez que há ainda muita controvérsia sobre a sua real ação no processo de reparação óssea, bem como com relação à sua forma de ação quando associados com outros materiais como a HA.

Conclusão

Com base nos resultados obtidos, pôde-se concluir que:

- o alendronato sódico não interferiu na reparação óssea no modelo experimental proposto;

- a associação do alendronato sódico com a HA também não interferiu na reparação óssea; e
- a HA granular utilizada neste trabalho mostrou-se biocompatível e absorvível.

Referências

- Alper G, Bernick S, Yazai M, Nimmi ME. Osteogenesis in bone defects in rats: the effects of hydroxyapatite and demineralized bone matrix. *Am J Med Sci.* 1989; 298: 371-6.
- Bernard GW. Healing and repair of osseous defects. *Dent Clin North Am.* 1991; 35: 469-77.
- Caria PHF. Enxerto periosteal e hidroxiapatita no tratamento da falha óssea produzida na pré-maxila de ratos [Dissertação de Mestrado]. Campinas: Instituto de Biologia da UNICAMP; 1999.
- Chang BS, Lee CK, Hong KS, Youn HJ, Ryu HS, Chang SS, etc. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials.* 2000; 21: 1291-8.
- Collins TA. Use of collagen tubes containing particulate hydroxylapatite for augmentation of edentulous atrophic maxilla: a preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg.* 1989; 47: 137-41.
- Cottrell DA, Wolford LM. Long-term evaluation of the use of coralline hydroxyapatite in orthognathic surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998; 56: 935-42.
- Dambacher MA, Schacht E. Osteoporose e metabólitos ativos da vitamina D: estado das coisa que virão. Jerusalém: TEVA Pharmaceutical Industries.
- Denissen H, Montanari C, Martinetti R, van Linger A, van den Hooff A. Alveolar bone response to submerged bisphosphonate-complexed hydroxyapatite implants. *J Periodontol.* 2000; 71: 279-86.
- Denissen H, Martinetti R, van Linger A, van den Hooff A. Normal osteoconduction and repair in and around submerged highly bisphosphonate-complexed hydroxyapatite implants in rat tibiae. *J Periodontol.* 2000; 71: 272-8.
- Fayad MVL. Reparação óssea sob ação de duas formulações de bisfosfonatos: estudo comparativo radiográfico e histológico [Dissertação de Mestrado]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2001.
- Galgut PN, Waite IM, Broohshaw JD, Kingston CP. A 4-year controlled clinical study into the use of a ceramic hydroxylapatite implant material for treatment of periodontal bone defects. *J Clin Periodontol.* 1992; 19: 570-7.
- Gosain AK, Song L, Yu P, Mehrara BJ, Maeda CY, Gold et al. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGH-[beta] isoforms. *Plast Reconstr Surg.* 2000; 106: 360-71.
- Higashi T, Okamoto, H. Influence of particle size of hydroxyapatite as a capping agent on cell proliferation of cultured fibroblasts. *J Endod.* 1996; 22: 236-9.
- Kulak C, Bilezibian J. Bisfosfonatos: características e utilização na osteropose. In: Bandeira F, Macedo G, Caldas G, Griz L, Faria M. Osteoporose. Rio de Janeiro: Medsi; 2000. p. 351-72.
- Lehtinen R, Kuusilehto A, Nikkanen UM. Bone response to hydroxyapatite particles of different shapes in rabbit tibia. *J Oral Maxillofac Surg.* 1990; 48: 1075-8.
- Mcclung M, Clemmesen B, Daifotis A, Gilchrist NL, Eisman J, Weinstein RS, et al. Alendronate prevents postmenopausal bone loss in women without osteoporosis. A double-blind, randomized, controlled trial. *Ann Intern Med.* 1998; 128: 253-61.
- Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basis regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000; 21: 115-37.
- Oliveira DT, Granjeiro JM, Maeda L, Chacon M, Fonseca MA, Taga EM, et al. Hidroxiapatita microgranular: comportamento biológico em tecido subcutâneo de ratos. *Rev Odontol UNESP.* 1993; 22: 197-202.
- Pescinini LM. Reação do tecido conjuntivo subcutâneo e do tecido ósseo da tibia a hidroxiapatita, pasta de Walkhoff e associação hidroxiapatita/pasta de Walkhoff. Estudo histológico em ratos [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 1995.
- Ramalho ACR Farmacologia da cálcio, vitamina D, paratormônio, calcitonina, bifosfonatos e SERMs. In: Silva P. Farmacologia. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2002. p. 795-806.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Metabolismo ósseo. In: Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Farmacologia. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001. p. 377-84.
- Reddy MS, Weatherford TW 3rd, Smith CA, West BD, Jeffcoat MK, Jacks TM. Alendronate treatment of naturally-occurring periodontitis in beagle dogs. *J Periodontol.* 1995; 66: 211-7.
- Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Caxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer.* 2000; 15(12 suppl): 2961-78.
- Salata LA, Craig GT, Brook IM. Bone healing following the use of hydroxyapatite or ionomeric bone substitutes alone or combined with a guided bone regeneration technique: an animal study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1998; 13: 44-51.
- Sherman S. Preventing and treating osteoporosis: strategies at the millennium. *Ann NY Acad Sci* [serial on the Internet]. 2001 Dec [cited 2002 Mar 14]; 949: 188-97. Available from: <http://gateway1.ovid.com/ovidweb.cgi>
- Silva CMOM. Avaliação do alendronato sódico sobre a reparação óssea na ausência dos hormônios ovarianos [Dissertação de Mestrado]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2000.

27. Solomon CG. Bisphosphonates and osteoporosis. *N Engl J Med* [serial on the Internet]. 2002 Feb [cited 2002 Apr 23]; 346 (9): 642. Available from: <http://gateway1.ovid.com/ovidwebcgi>.
28. Warner W. Hormônios da hemostasia. In: Yagiela JA, Neidle EA, Down FJ. *Farmacologia e terapêutica para dentistas*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2000. p. 434-54.