

FABIANA ROCHA ARAÚJO

**HIDROXIAPATITA, POLICAPROLACTONA E ALENDRONATO NA
REGENERAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS EXPERIMENTAIS NO
OLECRANO DE COELHOS COM OSTEOPOROSE INDUZIDA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A663h
2018

Araújo, Fabiana Rocha, 1990-

Hidroxiapatita, policaprolactona e alendronato na
regeneração de defeitos ósseos experimentais no olecrano de
coelhos com osteoporose induzida / Fabiana Rocha Araújo. –
Viçosa, MG, 2018.

x, 44 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Andréa Pacheco Batista Borges.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 33-44.

1. Osteoporose. 2. Medicina regenerativa. 3. Engenharia
tecidual. 4. Ossos - Regeneração. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

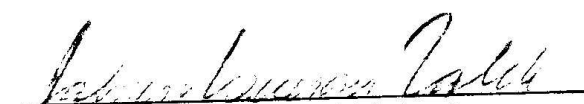
CDD 22. ed. 636.089671

FABIANA ROCHA ARAÚJO

**HIDROXIAPATITA, POLICAPROLACTONA E ALENDRONATO NA
REGENERAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS EXPERIMENTAIS NO
OLECRANO DE COELHOS COM OSTEOPOROSE INDUZIDA**

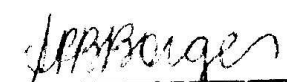
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2018.


Fabrício Luciani Valente
(Coorientador)


Rodrigo Viana Sepúlveda


Renato Barros Eleotério


Andréa Pacheco Batista Borges
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

A Deus, que esteve ao meu lado em todos os momentos, me dando saúde e força para seguir em frente.

Aos meus pais, Fábio e Silvana, pelo apoio e amor incondicional durante toda minha caminhada até aqui. Vocês são a minha base de tudo e sem vocês nada disso seria possível. Aos meus irmãos, Marta e Daniel, pelo exemplo carinho e incentivo. Amo vocês.

Ao meu namorado, Ricardo, pelo amor e companheirismo em todas as etapas desse trabalho e na vida. Obrigada pelo carinho, estímulo e compreensão nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora, Andréa, pelos valiosos ensinamentos durante todos esses anos. Obrigada pela confiança, paciência e pelos conselhos que vou levar comigo durante toda a vida.

À co-orientadora, Emily, pela disponibilidade em ajudar em diversos momentos do trabalho, por dividir seus conhecimentos com tamanho carinho e serenidade.

Ao co-orientador, Fabrício, por ser referência de profissional dedicado, atencioso e paciente! Muito obrigada pela ajuda imensurável, e principalmente pelas palavras de conforto nos momentos mais difíceis nesse período.

À colega de pós-graduação, Dayana, por não somente auxiliar nas cirurgias, mas por se fazer presente em todos os momentos se tornando uma amiga, com quem sabia que podia contar.

Aos colegas da pós-graduação Alan, Cris e Fernanda e a todos estagiários pelo auxílio nas cirurgias, dedicação e força.

A todos professores e pós-graduandos que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal ao longo da minha trajetória na pesquisa, em especial, Rodrigo e Renato.

Aos funcionários do Departamento de Veterinária que tornaram a execução deste trabalho mais fácil, em especial, Maninha, Carmen, Jurandir e Rosi.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, pelo auxílio na realização da microtomografia computadorizada.

À Professora Doutora Sheyla Maria Castro Máximo e ao seu laboratório JHS Laboratório Químico Ltda pelo fornecimento dos compósitos.

À Universidade Federal de Viçosa por todas as oportunidades e aprendizados.

À FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudo.

A todos os outros amigos e familiares que estiveram ao meu lado durante esta fase pelo companheirismo, risadas e apoio.

MUITO OBRIGADA.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Osteoporose	2
2.2. Biomaterial	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Aspectos éticos	10
3.2. Animais	10
3.3. Indução da Osteoporose	10
3.4. Indução do defeito ósseo	12
3.5. Exame clínico	13
3.6. Avaliação densitométrica radiográfica	14
3.7. Análise por microtomografia computadorizada	15
3.8. Análise histológica	16
3.9. Análise de dados	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1. Indução da Osteoporose	17
4.2. Exame clínico	18
4.3. Avaliação densitométrica radiográfica	21
4.4. Análise por microtomografia computadorizada	24
4.4 Análise histológica	27
5. CONCLUSÃO	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Cirurgia de ovariectomia em coelhas	11
Figura 2: Procedimento cirúrgico para realização do defeito ósseo experimental no olecrano direito de coelho	13
Figura 3: Exemplo de um dos gráficos e função linear obtidos a partir da análise do grau de cinza dos degraus do penetrômetro	15
Figura 4: Representação gráfica da média da densidade óssea dos animais antes da indução e no momento imediatamente antes da cirurgia para indução do defeito ósseo (Pós-indução)	17
Figura 5: Representação gráfica do número de animais por grupo que apresentaram sensibilidade dolorosa nos primeiros 7 dias	19
Figura 6: Representação gráfica do número de animais por grupo que apresentaram edema nos primeiros 7 dias	20
Figura 7: Radiografias mediolaterais do olecrano de coelho do grupo controle aos 07, 14, 28 e 42 dias após realização do defeito	21
Figura 8: Radiografias mediolaterais do olecrano de coelho dos grupos HAP+PCL e HAP+PCL+ALN aos 7 e 28 dias após realização do defeito ósseo	22
Figura 9: Radiografias mediolaterais do olecrano de coelho ao lado do penetrômetro dos grupos HAP+PCL e HAP+PCL+ALN aos 42 dias após realização do defeito ósseo	23
Figura 10: Densidade radiográfica média e desvio padrão obtidos na análise da região do defeito ósseo aos 0, 7, 14, 28 e 42 dias dos grupos HAP+PCL, HAP+PCL e Controle	24
Figura 11: Imagens da microtomografia do olecrano de coelho aos 42 dias	25
Figura 12: Representação gráfica da média e desvio padrão do percentual de volume ósseo obtido na análise da microtomografia da região do defeito ósseo no olecrano de coelho aos 42 dias	26
Figura 13: Representação gráfica da média e desvio padrão do número de trabéculas ósseas obtido na análise da microtomografia da região do defeito ósseo no olecrano de coelho aos 42 dias	26
Figura 14: Fotomicrografia da região do defeito realizado no olecrano de coelho após 42 dias da cirurgia do grupo controle	28
Figura 15: Fotomicrografia da região do defeito realizado no olecrano de coelho após 42 dias da cirurgia do grupo HAP+PCL	29

Figura 16: Fotomicrografia da região do defeito realizado no olecrano de coelho após 42 dias da cirurgia do grupo HAP+PCL+ALN 30

RESUMO

ARAÚJO, Fabiana Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Hidroxiapatita, policaprolactona e alendronato na regeneração de defeitos ósseos experimentais no olecrano de coelhos com osteoporose induzida.** Orientador: Andrea Pacheco Batista Borges. Coorientadores: Emily Correna Carlo Reis e Fabrício Luciani Valente.

A osteoporose é uma doença metabólica, caracterizada pelo desequilíbrio entre a formação e reabsorção óssea. A capacidade de regeneração fica comprometida, sendo muitas vezes necessária a utilização de enxertos, que, devido à fatores como baixa disponibilidade, morbidade associada ao local doador e a possibilidade de transmissão de doenças, tem dado lugar à biomaterial osteocondutor e reabsorvível. A utilização de medicamento associado aos compósitos pode trazer benefícios à reparação óssea. Um desses medicamentos é o alendronato, um dos mais potentes fármacos do grupo dos bifosfonatos, que tem sido largamente utilizado na prevenção da reabsorção óssea sistêmica na osteoporose. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial reparador do compósito hidroxiapatita (HAP), policaprolactona (PCL) e alendronato (ALN) em defeitos ósseos experimentais no olecrano de coelhas com osteoporose induzida. Foram utilizadas 18 coelhas, que passaram por ovariectomia e posterior aplicação de metilprednisolona 1mg/kg em dias alternados durante duas semanas para indução da osteoporose. Estabelecida a osteoporose, foi realizado defeito de 5 mm de diâmetro no olecrano, sendo todos defeitos preenchido por três diferentes tratamentos: HAP+PCL; HAP+PCL+ALN; e controle (sem preenchimento). Logo após o procedimento cirúrgico, foi realizada avaliação clínica dos animais, onde foram avaliados a presença ou ausência de dor, edema, deiscência e inflamação. Foram realizadas radiografias seriadas para acompanhamento da densidade radiográfica. Aos 45 dias após a cirurgia, foi realizada coleta do olecrano para processamento e posterior análise tomográfica e histopatológica. Características histológicas e avaliação clínica foram analisadas descritivamente. As variáveis quantitativas foram submetidas à análise de variância, seguido de teste de Tukey em caso de significância. A ovariectomia e a aplicação de glicocorticoide foram capazes de desencadear perda óssea significativa nos animais. Na avaliação clínica, a presença de edema se restringiu aos primeiros dias pós-operatório, com evolução clínica

satisfatória sugerindo biocompatibilidade do compósito. A densidade radiográfica dos animais que receberam algum tipo de tratamento foi significativamente maior que o grupo controle, diminuindo ao longo do tempo. A microtomografia computadorizada mostrou um crescimento de tecido ósseo em quase todo o defeito nos grupos HAP+PCL e controle, enquanto no grupo HAP+PCL+ALN haviam raras trabéculas ósseas restritas à borda do defeito ósseo. A histologia revelou formação de tecido ósseo imaturo entremeado à medula óssea e tecido conjuntivo nos grupos HAP+PCL e controle. No grupo HAP+PCL+ALN ocorreu inibição severa da regeneração óssea, havendo apenas a formação de uma matriz extracelular disposta de maneira desorganizada, que não se diferenciou em nenhum outro tecido. Concluiu-se que o compósito HAP+PCL é eficaz para o preenchimento de defeito ósseo crítico, entretanto, a aplicação local do alendronato interferiu negativamente na regeneração óssea.

ABSTRACT

ARAÚJO, Fabiana Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Hydroxyapatite, polycaprolactone and alendronate in regeneration of experimental bone defects in olecranon of rabbits with induced osteoporosis.** Adviser: Andrea Pacheco Batista Borges. Co-advisers: Emily Correna Carlo Reis and Fabrício Luciani Valente.

Osteoporosis is a metabolic disease, characterized by imbalance between bone formation and resorption. The regeneration ability is impaired, being often necessary to use grafts with due to factors like low availability, morbidity associated to the donor site and the possibility of disease transmission, have given rise to osteoconductive and resorbable biomaterials. The use of medication associated to composites may be beneficial to bone repair. One such drug is alendronate (ALN), one of the most potent drugs in the bisphosphonate group, that has been widely used to prevent systemic bone resorption in osteoporosis. The present study aimed to evaluate the repair potential of hydroxyapatite (HAP), polycaprolactone (PCL) and alendronate composites in experimental bone defects in the olecranon of rabbits with induced osteoporosis. Animals were submitted to ovariectomy and subsequent application of 1mg / kg methylprednisolone every other day for two weeks to induce osteoporosis. Once the osteoporosis was established, a 5 mm defect was made in olecranon, and defects were filled by three different treatments: HAP + PCL; HAP + PCL + ALN; and SHAM (unfilled). Right after surgical procedure, clinical evaluation of the animals was performed, in which pain, edema, dehiscence and inflammation were observed. Serial radiographs were performed to monitor radiographic density. At 45 days after surgery, olecranon was collected for processing and subsequent histopathological and microcomputed tomography analysis. Histological characteristics and clinical evaluation were analyzed descriptively. Quantitative variables were submitted to variance analysis, followed by Tukey test in case of significance. Ovariectomy and glucocorticoid application were able to trigger significant bone loss in the animals. In clinical evaluation, presence of edema was restricted to the first postoperative days, with a satisfactory clinical evolution suggesting composite biocompatibility. Radiographic density of animals that received some type of treatment was significantly higher than control group,

decreasing over the time. The microcomputed tomography showed bone tissue growth in almost all defects from HAP + PCL and control groups, whereas in HAP + PCL + ALN group there were rare bone trabeculae restricted to the defect edge. Histology revealed formation of immature bone tissue interspersed with bone marrow and connective tissue in HAP + PCL and control groups. In the HAP + PCL + ALN group, severe inhibition of bone regeneration occurred, with only formation of a disorganized extracellular matrix, which did not differentiate in any other tissue. Taken together, the results showed that the HAP + PCL composite is effective for critical bone defect filling, however, the local application of alendronate interfered negatively in bone regeneration.

1. INTRODUÇÃO

A engenharia tecidual e a medicina regenerativa avançam diariamente na busca de novos tratamentos para o reparo tecidual quando há grande perda óssea, como por exemplo, após traumatismos extensos, ressecções tumorais e osteoporose (CHOW, 2009; GOODMAN et al., 2013; PARK et al., 2015).

A osteoporose é uma doença metabólica do osso, caracterizada pelo desequilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea, havendo perda de massa e redução da densidade, acompanhada por danos na microarquitetura, que aumentam os riscos de fraturas, as quais frequentemente necessitam de um substituto ósseo quando já instauradas (AJDUKOVIC et al., 2005; UNDURTI, 2013).

Em consequência de fatores como baixa disponibilidade, morbidade associada ao local doador e a possibilidade de transmissão de doenças, enxertos autógenos e alógenos já há algum tempo têm dado lugar à utilização de biomaterial osteocondutor e reabsorvível. Este serve como um suporte para a formação óssea e gradativamente é reabsorvido pelo organismo, sem qualquer reação adversa (ROBERT; FRANK, 1994; DAVIES et al., 2010).

Os compósitos são materiais formados por dois ou mais componentes com distintas composições e propriedades. Seu desenvolvimento tem por finalidade produzir um material com características melhores ou mais adequadas para diferentes aplicações, como a associação de cerâmicas com polímeros para aproximar as propriedades mecânicas do biomaterial às do tecido ósseo (CARLO et al., 2009; LIU; WEBSTER, 2010).

O alendronato de sódio é um potente inibidor da reabsorção óssea, pertencente à classe dos bifosfonatos, e tem sido utilizado como principal terapia para a osteoporose (SOUZA, 2010).

Acredita-se que a utilização de biomateriais associados ao alendronato, pode ser uma boa alternativa quando a fratura estiver instituída, tendo em vista que na osteoporose a fratura é responsável pela alta morbidade, com elevada chance de mortalidade.

Assim sendo, esperando-se que a associação do alendronato ao compósito de hidroxiapatita e policaprolactona favoreça a regeneração óssea,

tornando uma opção de tratamento em casos clínicos em que existe grande perda de tecido ósseo em pacientes com osteoporose, desenvolveu-se o presente trabalho com o objetivo principal de avaliar os efeitos da associação de hidroxiapatita, policaprolactona e alendronato por meio da análise clínica, radiográfica, tomográfica e histológica em defeitos ósseos experimentais no olecrano direito de coelhos com osteoporose induzida.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 OSTEOPOROSE

A osteoporose é considerada um problema de saúde pública, devido à sua alta prevalência e os altos custos gerados pela fratura osteoporótica. Segundo Martini et al. (2009) a prevalência de osteoporose é de 4,4% na população brasileira, sendo as mulheres mais afetadas que os homens (7% versus 1,3%). Entretanto, essa baixa prevalência encontrada em alguns estudos não reflete a realidade, visto que, apenas uma a cada três pessoas com osteoporose é diagnosticada (MORAES et al., 2014). De acordo com Pinheiro e Eis (2010), se for adotada a definição de osteoporose em que o diagnóstico pode ser determinado pela presença de fraturas de baixo impacto, a prevalência de osteoporose encontrada é de pelo menos 12,8% em homens e 15,1% em mulheres. Além disso, os autores observaram que 12 meses após a fratura de fêmur, a taxa de mortalidade variou de 21,5% a 30%, com uma drástica redução na qualidade de vida.

A densidade mineral óssea (DMO) é uma importante medida de massa óssea, que auxilia na determinação do risco de osteoporose. Essa determinação é feita pelo valor de T-score, que é definido como o desvio padrão acima ou abaixo do valor médio da DMO para mulheres brancas jovens saudáveis. Os resultados são considerados, como Normal, quando a densitometria mostra até -1 desvio padrão no T-score; Osteopenia, de -1 a $-2,5$ DPs e Osteoporose de $\leq -2,5$ DPs (WHO, 1994).

A osteoporose pode ser classificada em osteoporose primária (tipo I e tipo II) e osteoporose secundária. A Osteoporose primária tipo I, também conhecida por osteoporose pós menopausa, está associada à deficiência de estrógeno, e atinge predominantemente o osso trabecular. A osteoporose primária tipo II, ou senil, está associada à redução da eficiência da remodelação óssea, deficiência do cálcio, vitamina D e aumento da secreção de paratormônio (PTH) (KORKIA, 2002). Já a osteoporose secundária é a perda óssea decorrente de uma desordem clínica específica, tais como: processos inflamatórios, alterações endócrinas (hipertireoidismo), desuso e uso de drogas (álcool, corticoides, etc.) (GALI, 2001).

Dentre as causas de osteoporose mais comuns entre as mulheres, destaca-se a deficiência de estrógeno no período pós-menopausa (EASTELL et al., 2016), enquanto nos homens, o uso excessivo de glicocorticoides figura como sendo uma das principais causas (NIH, 2015).

A remodelação óssea é um processo fisiológico contínuo e essencial na manutenção da integridade do esqueleto, sendo definida pela retirada de osso mineralizado, através da ação dos osteoclastos, e substituição por osteóides mineralizados (RADOMINSKI et al., 2004). Os sítios de ocorrência da remodelação óssea foram definidos como unidades de remodelação óssea ou unidades multicelulares básicas (BMUs), e são caracterizado pela ação conjunta de duas principais células: osteoclastos e osteoblastos (AUBIN; HEERSCHKE, 2003).

Este processo se inicia pela ação dos osteoclastos, células multinucleadas oriundas de células progenitoras de origem hematopoiética, que possuem como principal função a reabsorção do osso mineralizado por acidificação e digestão proteolítica (ALFORD; KOZLOFF; HANKENSON, 2015). Posterior à reabsorção, a formação óssea resulta de complexa cascata de eventos que envolvem a proliferação de células tronco mesquimais (MSCs) em osteoblastos. Os osteoblastos são células cuboides, polares e basofílicas, localizadas na superfície óssea e responsáveis pela síntese e mineralização da matriz óssea orgânica (AUBIN; HEERSCHKE, 2003; AMADEI; PEREIRA; CARVALHO, 2006). Após cumprirem seu papel, os osteoblastos podem ter três diferentes destinos: sofrem apoptose; tornam-se células do revestimento ósseo

ou tornam-se em osteócitos, que são incorporados na matriz óssea mineralizada (CAPULLI; PAONE; RUCCI, 2014).

As células osteogênicas interagem de diversas maneiras através de mecanismos autócrinos e parácrinos, envolvendo várias citocinas, fatores de crescimento e outros mediadores. O principal sistema modulador das funções do tecido ósseo é o sistema RANK/RANKL/OPG (AUBIN; HEERSCHKE, 2003).

O Ligante do Receptor para a Ativação do Fator Nuclear kappa-B (RANKL) é uma citocina pertencente à super família do Fator de Necrose Tumoral (TNF) produzida pelos osteoblastos. Sua principal função na fisiologia óssea é a estimulação da diferenciação osteoclástica e a inibição da apoptose dos osteoclastos (STEEVE et al., 2004). A ligação de RANKL ao seu receptor RANK (receptor ativador do fator nuclear kapa B), expresso nos osteoclastos e seus precursores, ativa a fusão e a diferenciação dos pré-osteoclastos em osteoclastos maduros. Os osteoblastos também produzem uma glicoproteína, chamada osteoprotegerina (OPG), que possui a capacidade de se ligar ao RANKL, evitando sua interação com RANK e consequentemente inibindo a osteoclastogênese e controlando a reabsorção do osso (NAKAGAWA et al., 1998).

Para manutenção da integridade do tecido ósseo, é necessário que haja um equilíbrio entre a formação óssea e a reabsorção óssea. Portanto, qualquer fator que interfira no sistema RANK/RANKL/OPG, pode alterar esse equilíbrio, resultando em osteopenia e possivelmente em doenças osteometabólicas, dentre elas, principalmente, a osteoporose. Diversas citocinas, hormônios, fatores de crescimento e drogas participam do metabolismo ósseo, podendo alterar esse equilíbrio, dentre elas: Interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 11 (IL-11), interleucina 17 (IL-17), prostaglandina E2, vitamina D, cálcio, paratormônio (PTH), estrógeno e glicocorticoides (WALSH; CHOI, 2003; HOFBAUER; SCHOPPET, 2004).

O estrógeno atua como um regulador negativo da atividade osteoclástica, suprimindo a produção de RANKL e aumentando a produção de OPG. Também é capaz de suprimir a produção de uma série de citocinas que estimulam a reabsorção óssea, incluindo IL-1, IL-6, TNF, e prostaglandinas. Por outro lado, os estrógenos reduzem a apoptose de osteoblastos, aumentando sua vida útil e assim a capacidade funcional de cada osteoblasto (KHOSLA; OURSLER;

MONROE, 2012). Sendo assim, a deficiência de estrógeno, acarreta em um aumento da reabsorção óssea e diminuição na formação óssea.

Já a ação dos glicocorticoides no tecido ósseo pode ser dividida didaticamente em efeitos diretos e indiretos. Os efeitos diretos estão relacionados à ação desta droga sobre as células ósseas e suas funções, enquanto os efeitos indiretos se devem à ação dos glicocorticoides sobre o metabolismo do cálcio e vitamina D, secreção dos hormônios sexuais e efeito sobre a produção de prostaglandinas, citocinas e fatores de crescimento (LANNA; MONTENEGRO JR.; PAULA, 2003; SOUZA et al., 2010). O principal efeito do excesso de glicocorticoide é a diminuição da formação óssea, uma vez que prejudicam a replicação, a diferenciação e a função dos osteoblastos, além de induzirem a apoptose de osteoblastos e osteócitos maduros (CANALIS et al., 2007). Por outro lado, os glicocorticoides aumentam a expressão de RANKL e diminuem a expressão de OPG, induzindo uma maior osteoclastogênese e consequentemente um aumento da reabsorção óssea (MANCINI; DOGA; GIUSTINA, 2004). Dentre os fatores indiretos, se destacam a diminuição da absorção intestinal, da reabsorção tubular de cálcio e do metabolismo da vitamina D, que resultam em hiperparatireoidismo secundário; diminuição na produção de esteroides gonadais; e alteração do metabolismo de citocinas, prostaglandinas e fatores de crescimento, por exemplo, alteração nos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF), que são importantes na manutenção da matriz óssea (CANALIS et al., 2007; LANNA; MONTENEGRO JR.; PAULA, 2003; TÓTH; GROSSMAN, 2013).

A avaliação da densidade mineral óssea é importante no diagnóstico e acompanhamento das patologias ósseas e pode ser feita por meio da densitometria óptica radiográfica. Muramoto et al. (2005) utilizaram essa ferramenta para estabelecer o valor da DMO do rádio em cães com diferentes idades e pesos. Filho e Sterman (2004) e Godoy et al (2005) estabeleceram os valores normais para densidade óssea do acessório do carpo em equinos. Berti et al (2005) compararam em níveis cinza e milímetros equivalentes de alumínio, a densidade óssea relativa mandibular, da região retro molar e região intermediária entre molares e pré-molares de humanos e concluíram que existe correlação entre os valores obtidos, reforçando a eficácia do método.

O tratamento da osteoporose pode ser dividido em duas classes: os tratamentos anabólicos (que estimulam a formação óssea), como por exemplo, administração de calcitriol (vitamina D), esteroides, hormônio de crescimento, paratormônio (PTH), teriparatida e ranelato de estrôncio; e tratamentos anticatabólicos, que inibem a reabsorção óssea, sendo os bisfosfonatos, representado principalmente pelo alendronato, os mais utilizados (SOUZA, 2010).

2.2 BIOMATERIAL

O tratamento utilizando drogas é a primeira escolha, entretanto, os agentes farmacológicos têm uma capacidade limitada de promover o reparo do tecido lesionado, principalmente nos casos em que há grande perda do tecido ósseo como na osteoporose, sendo muitas vezes necessário a utilização de enxertos.

Os enxertos ósseos autógenos não transmitem doenças infecciosas nem desencadeiam reações imunológicas, entretanto a disponibilidade deste tipo de enxerto é restrita, considerando que a perda óssea na osteoporose pode ser generalizada, tornando impossível coletar osso saudável suficiente do indivíduo afligido para transplante. Diante dessas limitações, os alo enxertos surgiram como possíveis substitutos, porém, eles também apresentam limitações importantes, tais como a falta de doadores, o risco de rejeição e de transmissão de doenças (PRECHEUR, 2007; KHAN et al., 2008; MIKAMI et al., 2014).

A limitação associada aos transplantes ósseos incentivou a busca por métodos alternativos, dentre os quais, se destaca a engenharia de tecidos com o uso de biomaterial. Este serve como um suporte para a formação óssea e pode ser gradativamente reabsorvido pelo organismo, sem qualquer reação adversa (ROBERT; FRANK, 1994; DAVIES et al., 2010).

Biomaterial pode ser definido como toda substância ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, utilizados em aplicações médicas interagindo com sistemas biológicos e que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo (JANDT, 2007).

O biomaterial deve possuir algumas características desejáveis para uso na ortopedia, dentre as quais, ser biocompatível, biodegradável, poroso, mecanicamente forte, maleável e facilitar a adesão das células para promover o

crescimento celular (CHEN; USHIDA; TATEISHI, 2002; NAIR; LAURENCIN, 2007).

A biocompatibilidade é quando um biomaterial apresenta propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros, de modo a estimular uma resposta adequada dos mesmos (SILVA et al., 2012). O biomaterial deve ser isento de produzir qualquer resposta biológica adversa local ou sistêmica, ou seja, o material não deve ser tóxico, carcinogênico, antigênico ou mutagênico (HABIBOVIC et al., 2005). Outra característica importante para avaliação do biomaterial na regeneração óssea é a osseointegração, caracterizada pela conexão funcional e estrutural direta entre o osso e a superfície do biomaterial (JANDT, 2007).

Carlo et al. (2009) avaliaram o compósito de hidroxiapatita e polihidroxibutirato em defeitos ósseos no olecrano de coelhos, demonstrando sua biocompatibilidade através da ausência de diferença significativa dos parâmetros avaliados no exame clínico, bem como da ausência de infiltrado inflamatório na histologia. Além disso, os autores observaram o contato direto entre o osso neoformado e o compósito através da avaliação radiográfica e histológica, indicando osseointegração. Observações semelhantes também foram feitas por Valente et al (2016), que estudaram o compósito de hidroxiapatita e policaprolactona, associado ou não ao alendronato, e também descreveram a biocompatibilidade e osseointegração do biomaterial.

A hidroxiapatita (HAP) é um componente mineral natural do osso, podendo ser obtida de fonte natural, como corais, ou sintéticas para uso como biomaterial, sendo amplamente adotada para regeneração do tecido ósseo (BORGES et al., 2000; HUANG et al., 2007).

A hidroxiapatita sintética pertence ao grupo das cerâmicas de fosfato de cálcio. Sua estrutura química é representada pela fórmula $\text{C}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com razão Ca/P de 1,67 e é o fosfato de cálcio mais estável e o menos solúvel desta família (COSTA et al., 2009). Sua ampla utilização é devido a sua biocompatibilidade, alta osteocondutividade, por não possuir imunogenicidade e por não estimular resposta inflamatória indesejável ou prejudicial (BORGES et al., 2000; CHEN et al., 2007; HUANG et al., 2007). Dentre essas características, uma das mais importantes é a osteocondutividade, ou seja, a HAP possui a capacidade de servir como suporte para o crescimento ósseo (TRUESSON et

al., 2010). A forma de degradação da HAP é mais uma de suas vantagens, uma vez que ocorre de forma semelhante ao processo de remodelação óssea, através da ação dos osteoclastos (BORGES et al., 2000; VACCARO et al., 2003).

Entretanto, a HAP como substituto ósseo cerâmico também apresenta algumas desvantagens, tais como fragilidade e inflexibilidade, não suportando alta tração (TANAKA et al., 2007; CARLO et al., 2009). Tais desvantagens inviabilizam o uso desta cerâmica como material de implante exclusivo em grandes defeitos ósseos (WANG, 2003).

Para minimizar as características individuais indesejáveis, é comum a associação de duas classes de biomateriais, formando o que se chama de compósito (LIU; WEBSTER, 2010). Um tipo de compósito muito utilizado na ortopedia é a associação de um biomaterial pertencente à classe das cerâmicas com um polímero, aprimorando as características mecânicas e biológicas do compósito final. A fragilidade intrínseca da cerâmica é superada pela flexibilidade do polímero, enquanto as cerâmicas fornecem ao compósito uma excelente osteocondução, característica rara nos polímeros (KIM, 2007; CHO et al., 2017).

A policaprolactona (PCL) é um poliéster semicristalino, com temperatura de transição vítrea de -60°C e um baixo ponto de fusão, entre $55-60^{\circ}\text{C}$ (BÖLGEN et al., 2005; NAIR; LAURENCIN, 2007), que se destaca entre os polímeros por possuir alta resistência mecânica e degradação compatível com a regeneração óssea (FABBRI et al., 2010). A degradação da PCL ocorre por clivagem hidrolítica dos grupos ésteres, de forma lenta e gradual, podendo demorar até 4 anos para sua degradação total, dependendo do peso molecular inicial (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

A PCL é biocompatível, biorreabsorvível e possui um baixo custo de fabricação. Outra importante característica é sua alta permeabilidade a muitos fármacos, que associadas à uma degradação lenta, e não toxicidade, faz com que seja considerada um excelente veículo de drogas a longo prazo (KIM; KNOWLES; KIM, 2004; NAIR; LAURENCIN, 2007; OSATHANON et al., 2017).

Uma das desvantagens é sua natureza hidrofóbica que resulta em um prejuízo na sua interação com os fluídos biológicos, na proliferação e adesão celular (CIPITRIA et al., 2011).

Cho et al. (2017) e Kim (2007) utilizaram a combinação de HAP e PCL e observaram aumento na característica hidrofílica, melhorando a interação biológica, além de uma característica mecânica adequada, indicando o uso promissor desse biomaterial.

Ao longo dos anos, o uso de drogas associadas aos biomateriais atraíram a atenção de muitos pesquisadores devido à sua eficácia para melhorar o crescimento e a regeneração dos ossos e dentes (LEE et al., 2017). O alendronato (ALN) é um medicamento da classe dos bisfosfonatos, sendo considerado o principal fármaco para o tratamento da osteoporose (GALI, 2001). Os bisfosfonatos são compostos caracterizados por apresentarem uma ligação $P - C - P$ em sua estrutura, e atuam principalmente inibindo a reabsorção óssea. São análogos químicos da substância endógena denominada “ácido pirofosfórico”, que no organismo se encontra como pirofosfato, um inibidor natural da reabsorção óssea (FERNANDES; LEITE; LANÇAS, 2005). Possuem alta afinidade pelo tecido ósseo ligando-se aos cristais de hidroxiapatita e depositando-se na matriz óssea mineralizada por longos períodos de tempo, até que ocorra a reabsorção óssea e sua internalização pelos osteoclastos (IZQUIERDO; OLIVEIRA; WEBER, 2011)

Além de inibir a reabsorção óssea, Knoch et al. (2005) demonstraram que o ALN diminui a apoptose de osteoblastos maduros e aumenta a diferenciação de osteoblastos a partir de células-tronco da medula óssea, indicando um provável efeito anabólico. Park et al. (2015) constataram que além de estimular uma maior diferenciação osteogênica “in vitro”, o alendronato quando associado à cerâmica, também aumentou a formação óssea em defeitos ósseos realizados na tíbia de ratos.

Embora seja amplamente utilizado no tratamento da osteoporose, existe o receio de que haja uma supressão excessiva da remodelação óssea, prejudicando a formação óssea e aumentando a fragilidade do osso (MASHIBA et al., 2000; ODVINA et al., 2005; IWATA et al., 2006). Além disso, Fournier et al. (2002) constataram que a administração de bifosfonatos inibiu as funções das células endoteliais *in vitro*, diminuindo a angiogênese. Ishtiaq et al. (2015), por sua vez, avaliaram o efeito do alendronato sobre os fatores pró-angiogênicos VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e ANG-1 (angiopoietina-1) em mulheres na fase pós-menopausa e concluíram que houve redução significativa

da concentração de ambos os fatores no período de 6 e 12 meses. Ainda no referido estudo, foram realizadas análises *in vitro* nas quais foram testadas diferentes concentrações de ALN e ácido zoledrônico em linhagens de células osteoblásticas, também havendo diminuição de VEGF.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

As normas de conduta para o uso de animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do DVT/UFV foram seguidas rigorosamente e o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa, sob protocolo 49/2014.

3.2. Animais

Foram utilizadas 18 coelhas da raça Nova Zelândia de seis meses de idade, os quais foram alojadas em gaiolas individuais, previamente higienizadas, e receberam ração duas vezes ao dia e água *ad libitum*.

3.3 Indução da osteoporose

A osteoporose foi induzida nos animais pela combinação de ovariectomia e aplicação de glicocorticoide adaptado de Kaveh et al. (2010).

Para a cirurgia de ovariectomia, os animais foram anestesiados com a associação de quetamina (12,5 mg/kg) e midazolam (1 mg/kg) via intramuscular e mantidos com isoflurano, administrado por via inalatória com o auxílio de máscara, diluído em oxigênio 100% em quantidade suficiente para a realização do procedimento. Cada animal recebeu imediatamente antes da cirurgia 25 mg/kg de cefazolina sódica, por via intramuscular, como profilaxia antimicrobiana e 0,2 mg/kg de meloxicam. Para o controle da dor no trans e pós-operatório imediato foi realizada anestesia epidural lombossacra com associação de lidocaína (0,2 ml/kg e morfina (0,1 mg/kg).

Com os animais anestesiados, foi realizada uma celiotomia mediana retro umbilical de 4 cm. Em seguida, foi realizada incisão na linha alba com exposição da cavidade abdominal (Figura 1A). O ovário esquerdo foi exposto e, após a identificação dos vasos ovarianos, os mesmos sofreram hemostasia temporária

preventiva com auxílio de uma pinça hemostática. Posteriormente, foi feita a ligadura dos vasos com fio ácido poliglicólico 2-0. O mesmo procedimento foi realizado no ovário direito (Figura 1B). Em seguida foi realizada sutura da linha alba com fio nylon 2-0 padrão Reverdin, subcutâneo com Vicryl 3-0 no padrão simples contínuo e por fim procedeu-se a sutura da pele com fio Nylon 2-0 no padrão Wolff (Figura 1C). A ferida foi então protegida com curativo e roupa cirúrgica (Figura 1D). A analgesia pós-operatória foi realizada com 10 mg/kg de tramadol via subcutânea, a cada 8 horas durante 5 dias. A administração do glicocorticoide foi iniciada 2 semanas após a ovariectomia, para que não interferisse na cicatrização da ferida cirúrgica. Foram administrados por via intramuscular na dose de 1 mg/kg de metilprednisolona em dias intercalados durante 2 semanas.

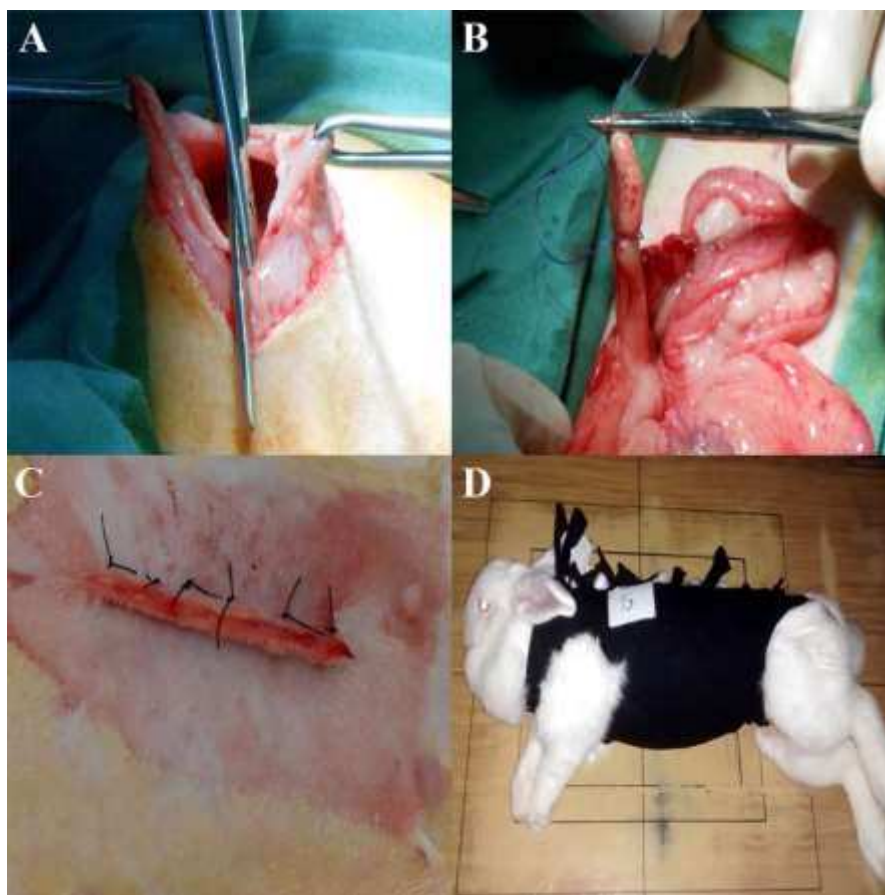


Figura 1: Cirurgia de ovariectomia em coelhas para indução da osteoporose. A – Abertura da cavidade abdominal. B – Ligadura dos vasos ovarianos. C – Fechamento da pele no padrão Wolff. D – Roupa cirúrgica para proteção da ferida.

3.4 Indução do defeito ósseo

Seis semanas após o término da aplicação do glicocorticoide, os animais foram submetidos a novo procedimento cirúrgico. O protocolo anestésico foi semelhante ao utilizado na ovariectomia, diferindo apenas no tipo de bloqueio regional utilizado. Para este procedimento, foi feito o bloqueio do plexo braquial no membro torácico direito com lidocaína na dose de 7 mg/kg.

Após tricotomia e antissepsia, foi realizada uma incisão curva de pele na superfície lateral da articulação úmero radio ulnar (Figura 2A) e posterior incisão na fáscia muscular do tríceps braquial, permitindo assim afastar parte do ventre da cabeça lateral e do tendão do músculo tríceps braquial em direção proximal ao olecrano e liberando parte da inserção lateral do tendão com uma lâmina de bisturi. Em seguida, foi realizada uma incisão reta de aproximadamente três centímetros de comprimento na bolsa tricipital, expondo assim, a superfície lateral do olecrano. Uma falha óssea foi realizada na cortical lateral do olecrano (Figura 2B), com o auxílio de uma broca trefina de 5 mm de diâmetro, acoplada a uma perfuratriz elétrica. Durante a perfuração, o local foi irrigado com solução fisiológica estéril para evitar aquecimento. Neste momento, cada animal recebeu o tratamento, segundo o grupo experimental (Figura 2C), descrito abaixo:

- 1) Compósito de hidroxiapatita (50%) e policaprolactona (50%), constituindo o tratamento HAP+PCL;
- 2) Compósito de hidroxiapatita (49,5%), policaprolactona (49,5%) e alendronato (1%), constituindo o tratamento HAP+PCL+ALN;
- 3) Sem preenchimento, constituindo o grupo controle.

Cada tratamento foi aplicado em 6 animais. Para a aplicação dos tratamentos, 250 mg de cada compósito, fornecido em pó, foi diluído em 0,1 ml de solução salina 0,9% no momento da cirurgia (Figura 2D) para a obtenção de uma pasta capaz de preencher o defeito. Todos os compósitos estudados foram desenvolvidos pelo JHS Laboratório Químico Ltda., em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Em seguida, a bolsa tricipital, o tendão do músculo tríceps braquial e parte lateral da cabeça do músculo tríceps braquial foram suturadas com fio de náilon 2-0 em padrão Sultan e, em seguida, a pele foi aproximada em padrão Wolff,

também com fio náilon 2-0. Nos cuidados pós-operatórios, os animais receberam morfina 1mg/kg a cada 8 horas no primeiro dia, sendo substituída por tramadol 10 mg/kg a cada 8 horas nos 4 dias seguintes.



Figura 2: Procedimento cirúrgico para realização do defeito ósseo experimental no olecrano direito de coelho. A – Incisão curva na pele na superfície lateral da articulação úmero radio ulnar. B – Defeito ósseo na cortical lateral do olecrano (seta branca). C – Defeito ósseo preenchido com o compósito HAP+PCL+ALN (seta preta). D – Diluição do compósito com solução salina para obtenção de uma pasta a fim de facilitar o preenchimento do defeito.

3.5 Exame clínico

Os animais foram submetidos a exame clínico diariamente, sendo avaliado conforme o modelo proposto por Reis et al. (2010) quanto à deiscência, reação inflamatória exsudativa da ferida cirúrgica, edema e sensibilidade dolorosa.

A deiscência da sutura, reação inflamatória e edema foram classificados de acordo com a presença ou ausência dos mesmos. Já a sensibilidade dolorosa foi avaliada pela distribuição de escores mediante a reação do animal ao toque da ferida cirúrgica e flexão e extensão da articulação úmero rádio ulnar, atribuindo-se os escores: 0 – Ausente, quando os animais não demonstraram nenhum tipo de reação ao toque da área operada; 1 - discreta, quando houve retração do membro, sem nenhuma outra manifestação; 2 – moderada, quando houve vocalização associada à retração do membro, ou tentativa de fuga 3 - intensa quando, além das características de dor discreta e moderada, o animal apresentou-se prostrado e sem interesse pelo alimento.

3.6 Avaliação densitométrica radiográfica

Para confirmar a indução da osteoporose, foram realizadas radiografias na posição mediolateral do membro torácico direito no momento antes da cirurgia de ovariectomia e a cada sete dias após o início da aplicação do glicocorticoide até o momento imediatamente antes cirurgia para indução do defeito ósseo.

Para avaliar o tratamento, foram realizadas radiografias na posição mediolateral do membro torácico direito imediatamente após a cirurgia e nos dias sete, 14, 28 e 42 após a indução do defeito. A técnica radiográfica foi padronizada para a distância de um metro da fonte de emissão dos raios X pelo aparelho ao filme radiográfico, com kilovoltagem de 45 Kv, miliamperagem de 100 mA e tempo de 0,07 segundos.

Todas as radiografias foram tomadas com um penetrômetro de alumínio, constituído por cinco degraus, com espessura de 0,3 mm entre cada um deles, posicionado próximo ao olecrano.

As imagens digitalizadas foram analisadas no programa Image J, que forneceu valores médios dos níveis de cinza para cada região selecionada.

Em cada degrau foi selecionada uma área de 25 x 200 pixels, com auxílio da ferramenta de seleção retangular, sendo então aferida a tonalidade média de cinzas. Os valores obtidos foram armazenados sob a forma de tabelas para cada imagem analisada, a fim de que cada uma tivesse a sua própria escala padrão. Posteriormente, a ferramenta de seleção de área elíptica foi utilizada para obtenção do valor do grau de cinza da região do defeito no olecrano, no tamanho de 50 x 50 pixels. Estes valores foram registrados nas tabelas, juntamente com

as informações de suas respectivas escalas de alumínio, para, então, serem convertidos à unidade de mm Al, mediante a construção de um gráfico e sua regressão linear obtidos com base no penetrômetro, no programa Excel (Figura 3).

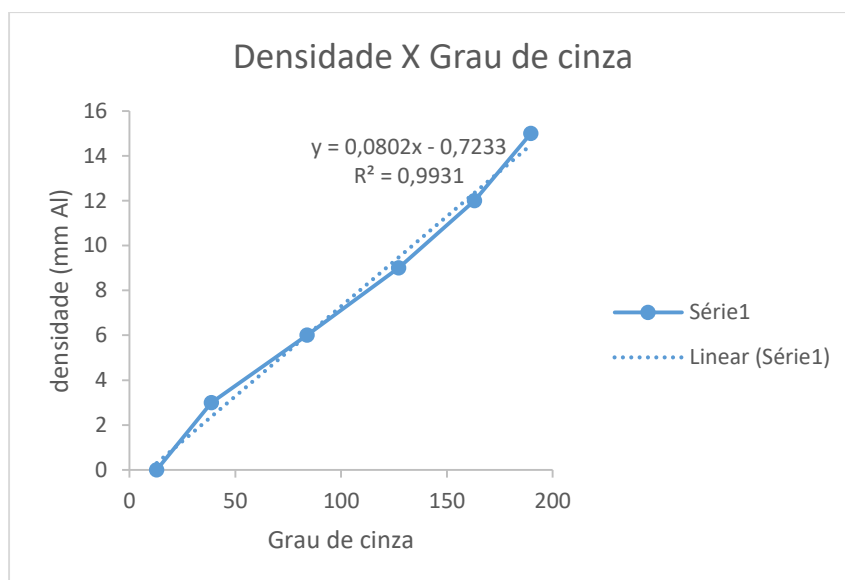


Figura 3: Exemplo de um dos gráficos e função linear obtidos a partir da análise do grau de cinza dos degraus do penetrômetro.

3.7 Análise por microtomografia computadorizada

Aos 42 dias após a cirurgia, os animais sofreram eutanásia por sobredose de propofol e cloreto de potássio de acordo com as normas exigidas pela Resolução 1000/2012 do CFMV. Em seguida, foi realizada a coleta do olecrano, o qual foi dissecado e separado da ulna com o auxílio de uma serra manual. As amostras foram fixadas em formol 10% por 72 horas, e mantidas em álcool 70% até o processamento final.

A análise por microtomografia computadorizada foi realizada de acordo com Reis et al. (2010). Todos os fragmentos foram escaneados pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Kontich, Belgium) utilizando resolução de 11.2 μm , 50 kV e 800 μA , e filtro de alumínio de 0,5 mm. As imagens obtidas foram reconstruídas pelo *software* NRecon (SkyScan, versão 1.7.0.4) e analisadas através do *software* CTAn (SkyScan, versão 1.16) para os seguintes parâmetros: BV/TV (porcentagem do volume ósseo), Tb.N

(número de trabéculas), Tb.Th (espessura média das trabéculas) e Tb.Sp (separação entre as trabéculas).

Para que as análises fossem realizadas de forma mais fidedigna possível, foi padronizada uma região de interesse (ROI) circular de 5 mm, sendo o *slice* inicial (*top*) quando era possível visualizar as bordas do defeito, e o *slice* final (*bottom*) no limite entre o fim do defeito e o início da cortical medial. Além disso, após definir o ROI, foi necessário definir um valor limiar para binarização (*threshold*). Após obter o *threshold* que mais se assemelhou à imagem original para cada amostra, foi feita a média dos valores obtidos. Dessa forma, foi determinado um limite inferior em 43 e um limite superior em 168 (*grayscale threshold* 0 – 255), sendo a mesma binarização utilizada para todas as amostras.

3.8 Análise histológica

Os fragmentos fixados foram processados segundo técnicas histológicas de rotina, sendo descalcificados em solução de ácido fórmico e citrato de sódio, desidratados em soluções crescentes de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Cortes de 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo de rotação e corados em hematoxilina e eosina.

Foram realizadas as avaliações histológicas com relação ao tecido ósseo neoformado em toda extensão do defeito, sendo observadas as características das trabéculas ósseas e remodelação das mesmas, dos espaços medulares.

3.9 Análise dos dados

As características histológicas e a avaliação clínica foram analisadas descritivamente.

A densidade radiográfica da indução da osteoporose foi analisado pelo teste t-pareado, enquanto a densidade radiográfica da avaliação dos tratamentos foi submetida à análise de variância (ANOVA) de dois fatores para medidas repetidas.

Os parâmetros da tomografia foram submetidos a teste de normalidade e homogeneidade de variância e em seguida aplicada análise de variância (ANOVA). Em caso de significância para todas as avaliações, foi procedido o teste de Tukey.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa SigmaPlot 11.0, considerando-se nível de significância de 5% para todas as variáveis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Indução da osteoporose

O modelo de indução utilizado no presente trabalho foi baseado em estudos realizados por Castañeda et al. (2008) e Kaveh et al. (2010) no qual observaram que para a indução da osteoporose em coelhas, apenas a ovariectomia não é suficiente, sendo necessária a associação com a aplicação de glicocorticoide.

A densidade radiográfica média dos animais antes do processo de indução da osteoporose, ou seja, antes da ovariectomia foi igual a $2,305 \pm 0,488$ mm Al. Em contrapartida, após a indução, no momento imediatamente antes da cirurgia da indução do defeito ósseo, a densidade radiográfica foi de $1,575 \pm 0,174$ mm Al (Figura 4), representando uma queda significativa ($P < 0,05$) da densidade ao longo do tempo, comprovando que o protocolo adotado para indução da osteoporose foi capaz de desencadear perda óssea nesses animais, conforme esperado.

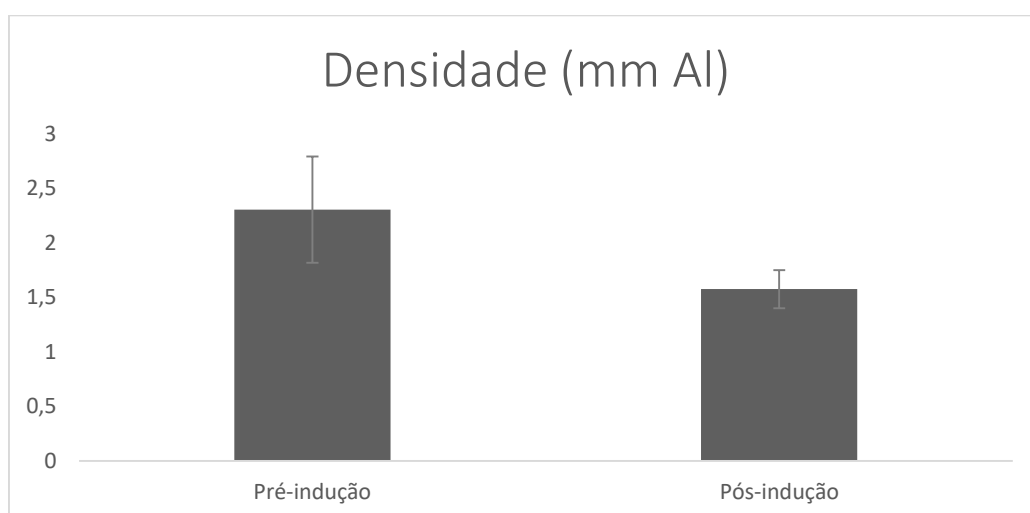


Figura 4: Representação gráfica da média da densidade óssea dos animais antes da indução (pré-indução) e no momento imediatamente antes da cirurgia para indução do defeito ósseo (Pós-indução), com base no teste t-pareado, $p < 0,05$.

A deficiência do estrógeno associada à administração de glicocorticoide foi capaz de promover um desequilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea, possivelmente através do aumento da produção de RANKL, diminuição de OPG e da diferenciação e função dos osteoblastos, conforme descrito por Canalis et al (2007), Khosla et al (2012) e Mancini et al (2004).

A redução da densidade mineral óssea em termos percentuais foi de aproximadamente 31,6%, semelhante ao resultado encontrado por Baofeng et al. (2010), que observaram uma redução de 36% na densidade dos animais que receberam corticoide associado à ovariectomia. É importante ressaltar que a osteoporose humana é definida como uma redução na DMO de mais de 2,5 desvio-padrão (WHO, 1994), o que seria equivalente a aproximadamente 25%, indicando que a perda óssea foi suficiente para ser caracterizada como osteoporose.

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 1994) também definiu que a densitometria óssea é a ferramenta padrão para o diagnóstico da osteoporose, entretanto, na medicina veterinária existe o inconveniente de que o paciente a ser examinado deve permanecer, no mínimo de 10 a 15 minutos imóvel, sendo necessário a utilização de protocolos anestésicos para a realização do exame (TOLL et al., 1994). Por outro lado a Densitometria Óptica Radiográfica, adotada no presente trabalho, possui vantagens como baixo custo, rapidez, precisão, e simplicidade de execução quando comparada às outras técnicas utilizadas (FILHO; STERMAN, 2004; MURAMOTO; STERMAN; PINTO, 2005).

4.2 Exame clínico

As avaliações clínicas são importantes para avaliar a eficácia da técnica cirúrgica, o bem-estar dos animais no período pós-operatório, além de sugerir a biocompatibilidade dos compósitos. Dessa forma, ao observar a agitação dos animais com a presença do avaliador, e considerando uma maior susceptibilidade à fratura desses animais devido a osteoporose, todas as avaliações foram adaptadas de forma que a manipulação fosse a menor possível.

A sensibilidade dolorosa ao toque e extensão do membro operado foi observada durante os primeiros dias do pós-operatório (Figura 5), sendo classificada como grau 1 em todos os casos, ou seja, quando houve apenas retração do membro. Todavia, a avaliação da dor é subjetiva e pode ter sido influenciada pelo desconforto que esses animais sentem ao serem manipulados, uma vez que, ao tocar o membro que não foi operado, muitos deles esboçavam a mesma reação. Resultados semelhantes foram descritos por Carlo et al. (2009), que também ressaltou que a dor pode ser melhor avaliada durante a avaliação da claudicação. Entretanto, tal parâmetro não pôde ser realizado, pelos motivos citados acima, sendo a medicação analgésica mantida durante os sete dias, visando garantir o bem-estar desses animais.

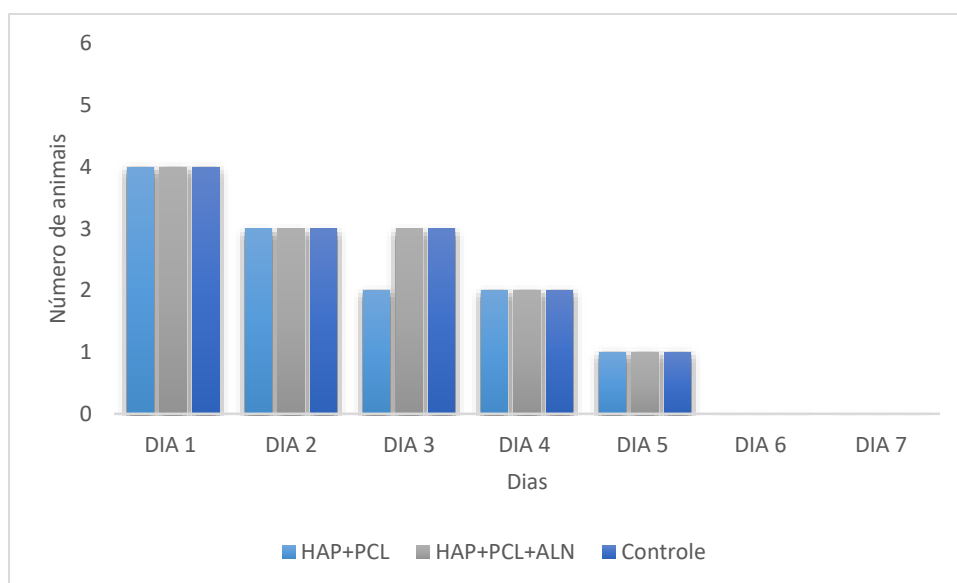


Figura 5: Representação gráfica do número de animais por grupo que apresentaram sensibilidade dolorosa nos primeiros sete dias. O escore atribuído em todos os casos foi grau 1.

O edema esteve presente, em grau discreto e apenas no sítio cirúrgico, em todos os animais nos primeiros dois dias de avaliação, e foi decrescendo até o 7º dia pós-operatório (Figura 6), quando só foi observado nos animais que tiveram deiscência de algum ponto. De acordo com Carlo et al. (2009) e Ochoa (2013) a presença do edema é uma condição clínica esperada, e pode ser atribuída à manipulação dos tecidos durante o procedimento cirúrgico.

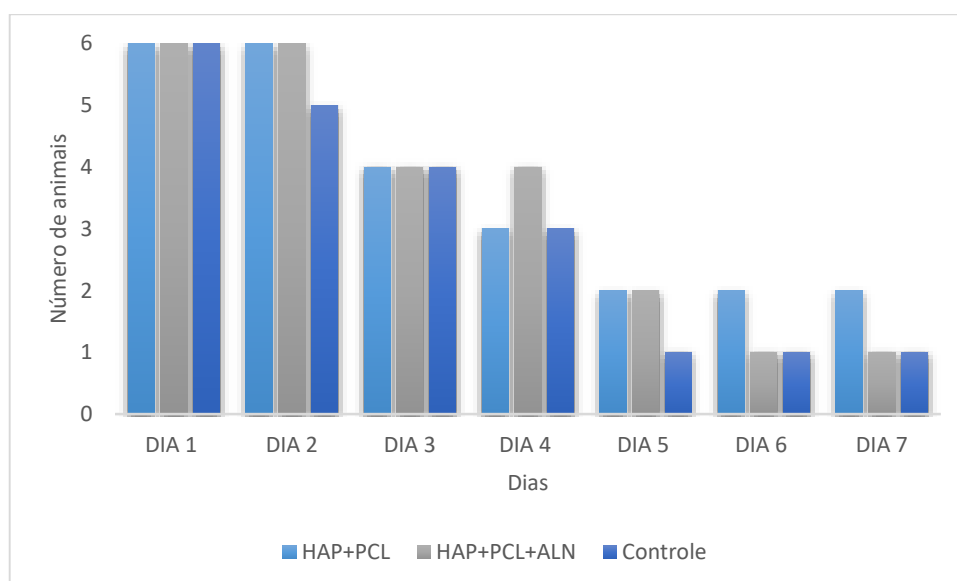


Figura 6: Representação gráfica do número de animais por grupo que apresentaram edema nos primeiros sete dias.

A deiscência e reação inflamatória exsudativa da ferida estiveram diretamente relacionadas. Dois animais do grupo HAP+PCL, um animal do grupo HAP+PCL+ALN e um animal do grupo controle apresentaram deiscência de pelo menos um ponto da pele, seguida de infecção. O rompimento dos pontos foi causado pela interferência dos animais, que possuem fácil acesso à ferida cirúrgica, retiram o curativo com facilidade e não se adaptam ao colar elisabetano, que dificulta a alimentação. Foi realizada a associação entre a interferência do animal na ferida cirúrgica e a ocorrência de infecção no sítio cirúrgico é comum na Medicina Veterinária (CORSINI et al., 2014), principalmente quando não é possível limitar o acesso dos mesmos à ferida.

A evolução clínica dos animais foi satisfatória, de forma que a partir da segunda semana os animais não apresentavam nenhum sinal clínico evidente, indicando que todas as alterações observadas provavelmente foram causadas pelo procedimento cirúrgico e interferência do animal, e não por reação ao biomaterial implantado. Observações semelhantes foram feitas por Perdigão (2015), que ao avaliar diferentes compósitos de hidroxiapatita, fibroína de seda e ácido hialurônico, também não observou sinais de rejeição, sugerindo a biocompatibilidade dos mesmos.

4.3 Avaliação densitométrica radiográfica

Durante a avaliação das radiografias obtidas no pós-operatório imediato e aos sete dias do grupo controle (Figura 7A), foi possível delimitar as bordas do defeito ósseo sem nenhuma alteração de radiopacidade. Aos 14 e 28 dias, ainda era possível visualizar o limite entre o defeito e o osso circunvizinho, entretanto, houve aumento de radiopacidade (Figuras 7B e 7C). A redução do tamanho do defeito ósseo foi observada aos 42 dias (Figura 7D), quando a radiopacidade em alguns animais foi semelhante ao do osso circunvizinho, indicando formação de tecido ósseo (CARLO et al., 2009).

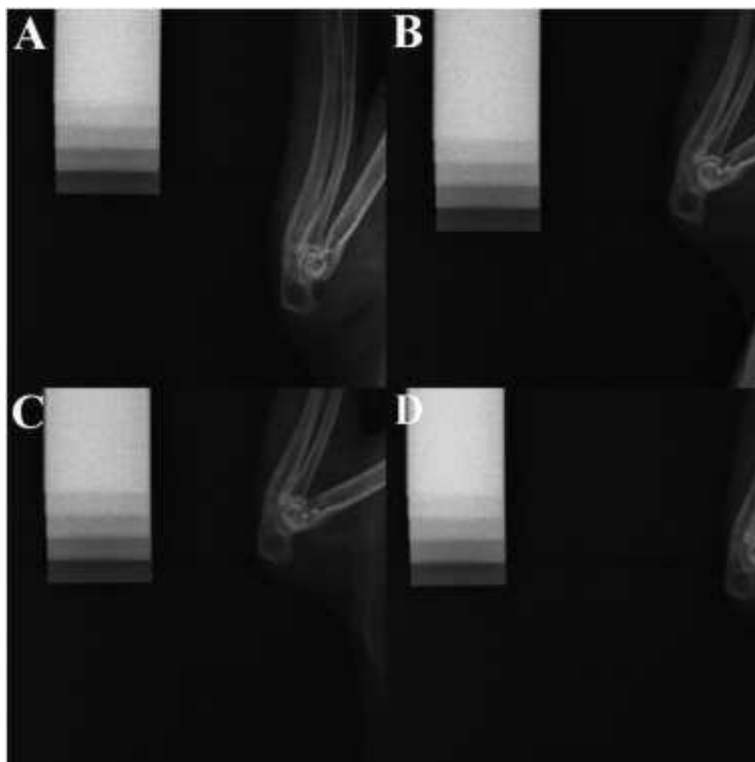


Figura 7: Radiografias mediolaterais do olecrano de coelho do grupo controle ao lado do penetrômetro. A – 07 dias após realização do defeito ósseo. B – 14 dias após realização do defeito ósseo. C – 28 dias após realização do defeito ósseo. D – 42 dias após realização do defeito ósseo. Nota-se aumento da radiopacidade e diminuição do defeito ósseo ao longo do tempo.

Por outro lado, foi difícil a delimitação das bordas do defeito na radiografia do pós-operatório imediato e aos sete dias dos animais que receberam algum

tratamento (Figuras 8A e 8B). Aos 14 e 28 dias foi possível notar um decréscimo na radiopacidade (Figuras 8C e 8D), tornando possível a visualização das bordas do defeito. Aos 42 dias, houve redução do tamanho do defeito nos animais que receberam HAP+PCL, entretanto, essa redução foi sutil nos animais que receberam HAP+PCL+ALN, sendo possível delimitar as bordas do defeito em alguns animais (Figura 9). Essa diferença observada entre os dois tratamentos, é sugestiva de uma menor formação óssea nos animais que receberam alendronato, diferente do que foi observado por Ochoa (2013) que afirmou que não foi possível delimitar as bordas do defeito ósseo dos animais que receberam HAP+PCL e HAP+PCL+ALN aos 45 dias.

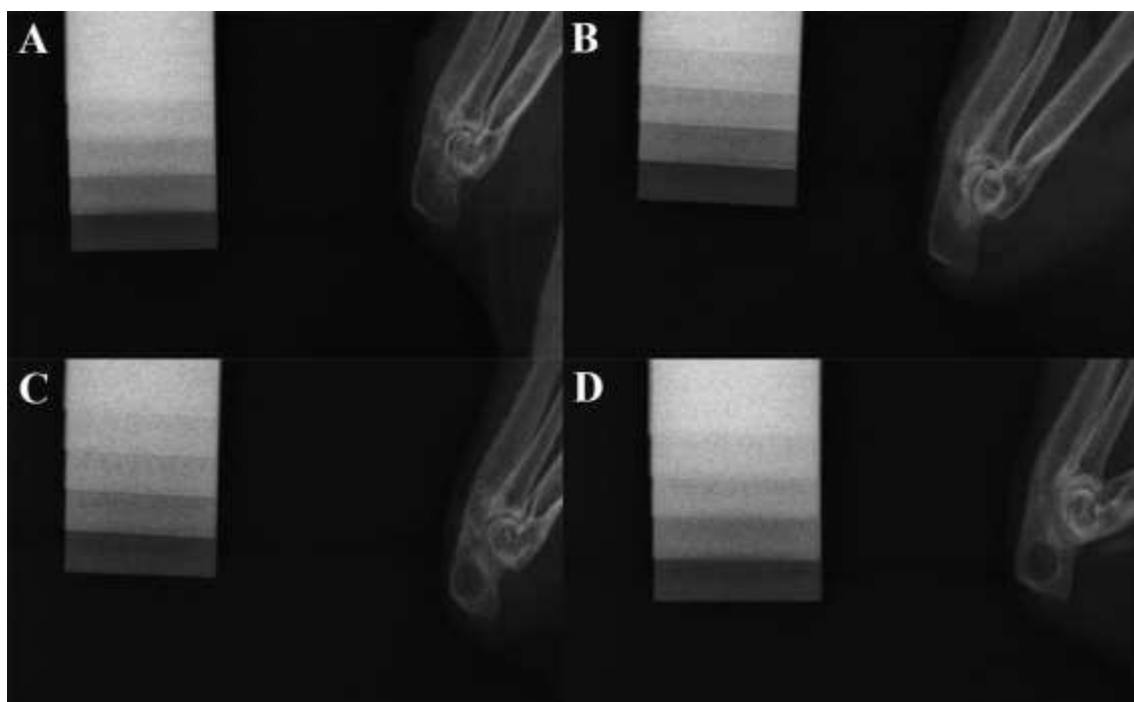


Figura 8: Radiografias mediolaterais do olecrano de coelho ao lado do penetrômetro. A – Animal do grupo 1 (HAP+PCL) 07 dias após realização do defeito ósseo. B – Animal do grupo 2 (HAP+PCL+ALN) 07 dias após realização do defeito ósseo. C – Animal do grupo 1 (HAP+PCL) 28 dias após realização do defeito. D – Animal do grupo 2 (HAP+PCL+ALN) 28 dias após realização do defeito ósseo.

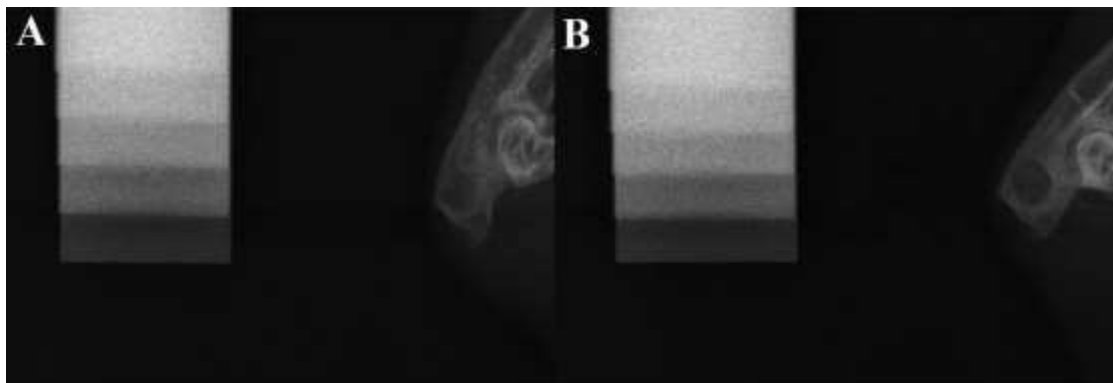


Figura 9: Radiografias mediolaterais do olecrano de coelho ao lado do penetrômetro. A – Animal do grupo 1 (HAP+PCL) 42 dias após realização do defeito ósseo. B – Animal do grupo 2 (HAP+PCL+ALN) 42 dias após realização do defeito ósseo.

Os animais que receberam os compósitos HAP+PCL e HAP+PCL+ALN apresentaram densidade radiográfica significativamente maior em relação ao grupo controle ($P < 0,05$) em todos os tempos avaliados (Figura 10). Essa diferença entre a densidade é causada provavelmente pela presença da hidroxiapatita nos compósitos, que possui elementos com alto número atômico, e faz com que possua uma maior radiopacidade (DUARTE et al., 2007; REIS et al., 2010).

Além disso, a densidade diminuiu ao se comparar, em ambos os tratamentos, o dia sete com o dia 42, não havendo diferença significativa nos períodos intermediários. A diminuição da radiopacidade pode ser atribuída ao crescimento de tecido conjuntivo no processo normal de regeneração óssea do defeito ósseo somada à biodegradação da hidroxiapatita (BORGES et al., 2000; VITAL et al., 2008; SILVA et al., 2012).

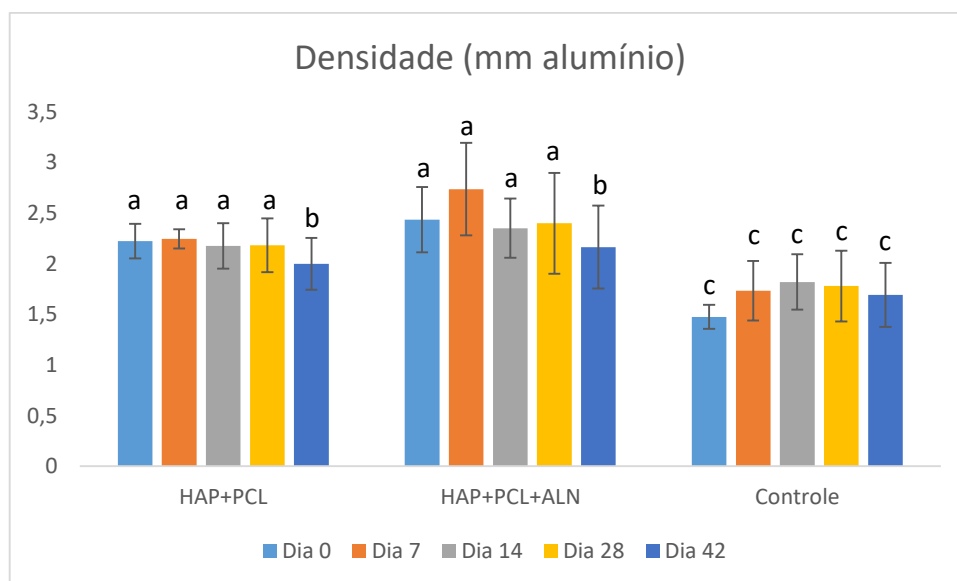


Figura 10: Densidade radiográfica média e desvio padrão obtidos na análise da região do defeito ósseo aos 0, 7, 14, 28 e 42 dias dos grupos HAP+PCL, HAP+PCL e Controle. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) na análise de variância (ANOVA) de dois fatores para medidas repetidas.

No presente estudo, a densidade óptica radiográfica mostrou ser um exame com sensibilidade suficiente para acusar as alterações de densidade radiográfica nos diferentes períodos analisados, conforme descrito por outros autores (LOUZADA et al., 1998; FILHO; STERMAN, 2004; BERTI et al., 2005; GODOY et al., 2005; MURAMOTO; STERMAN; PINTO, 2005).

4.4 Análise por microtomografia computadorizada

A microtomografia computadorizada é uma técnica que tem atraído a atenção dos pesquisadores em diversos estudos do tecido ósseo por sua natureza não destrutiva, que possibilita o aproveitamento das amostras em outros ensaios, e principalmente por permitir a caracterização e a mensuração da regeneração do tecido ósseo em três dimensões (BOUXSEIN et al., 2010; FERNANDES, 2014).

Durante a avaliação qualitativa da regeneração do tecido ósseo na região do defeito do grupo controle e do grupo que recebeu o tratamento HAP+PCL, foi possível notar crescimento de tecido ósseo em quase todo o defeito (Figuras 11A e 11C), com trabéculas ósseas recém-formadas, delgadas, em crescimento centrípeto. Em contrapartida, nos animais que receberam o compósito HAP+PCL+ALN a neoformação óssea se restringiu às bordas do defeito (Figura

11B), sugerindo que a presença do alendronato no compósito inibiu a formação óssea, ao contrário dos resultados apresentados por Park et al. (2015), em que a associação do alendronato a uma cerâmica aumentou a formação óssea quando comparado ao grupo controle e ao grupo que recebeu somente a cerâmica.

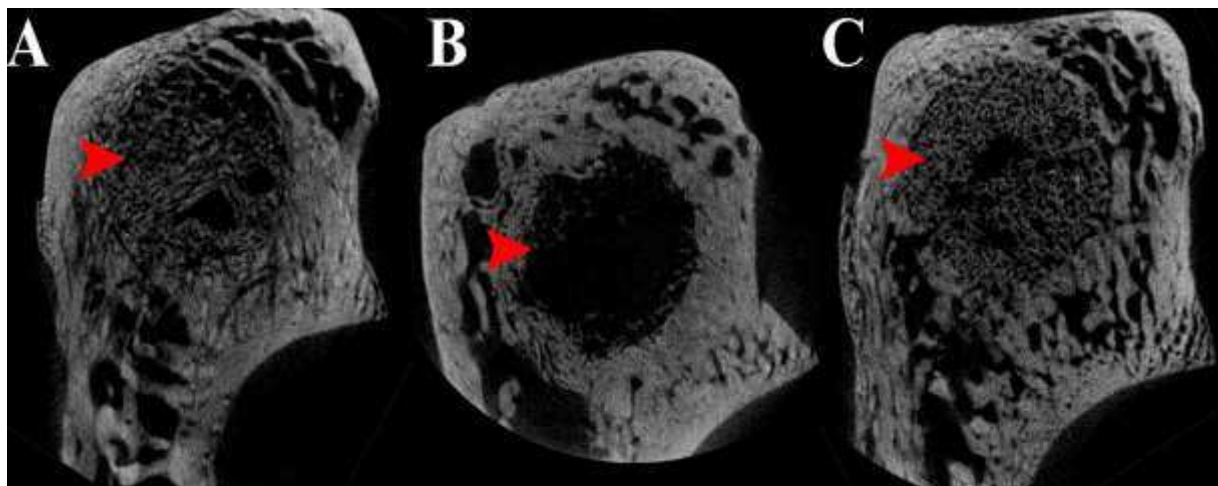


Figura 11: Imagens da microtomografia do olecrano de coelho aos 42 dias. A – Olecrano de animal que recebeu o compósito HAP+PCL. B – Olecrano de animal que recebeu o compósito HAP+PCL+ALN. C – Olecrano de animal que não recebeu nenhum compósito (grupo controle). Notar região do defeito (cabeça de seta) preenchida por trabéculas ósseas recém-formadas no grupo HAP+PCL e no grupo controle, em contraste com o grupo HAP+PCL+ALN que apresentou poucas trabéculas, restrita à borda do defeito. Este padrão de formação óssea se repetiu em todos os animais de cada grupo.

De acordo com a análise estatística, o grupo HAP+PCL+ALN apresentou valor médio do percentual de volume ósseo (BV/TV) significativamente ($p < 0,05$) mais baixo do que os obtidos no grupo controle e no grupo HAP + PCL. É possível também notar que o grupo que recebeu alendronato mostrou maior variação individual (Figura 12).

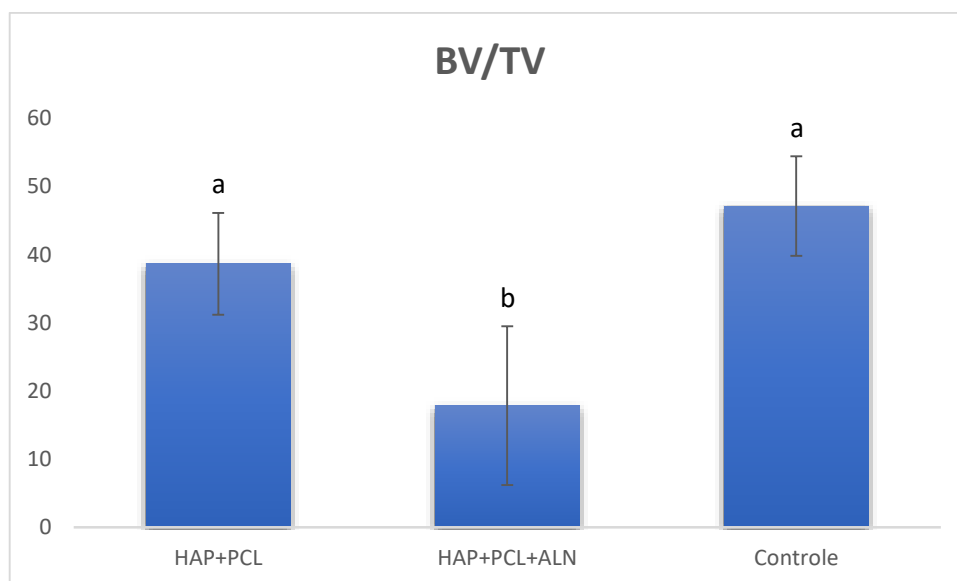


Figura 12: Representação gráfica da média e desvio padrão do percentual de volume ósseo obtido na análise da microtomografia da região do defeito ósseo no olecrano de coelho aos 42 dias. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) na análise de variância (ANOVA).

Essas diferenças entre os tratamentos foram também observadas na análise do número de trabéculas (Tb.N). O grupo controle e o grupo HAP+PCL tiveram valores significativamente maiores ($P < 0,05$) que o grupo HAP+PCL+ALN (Figura 13).

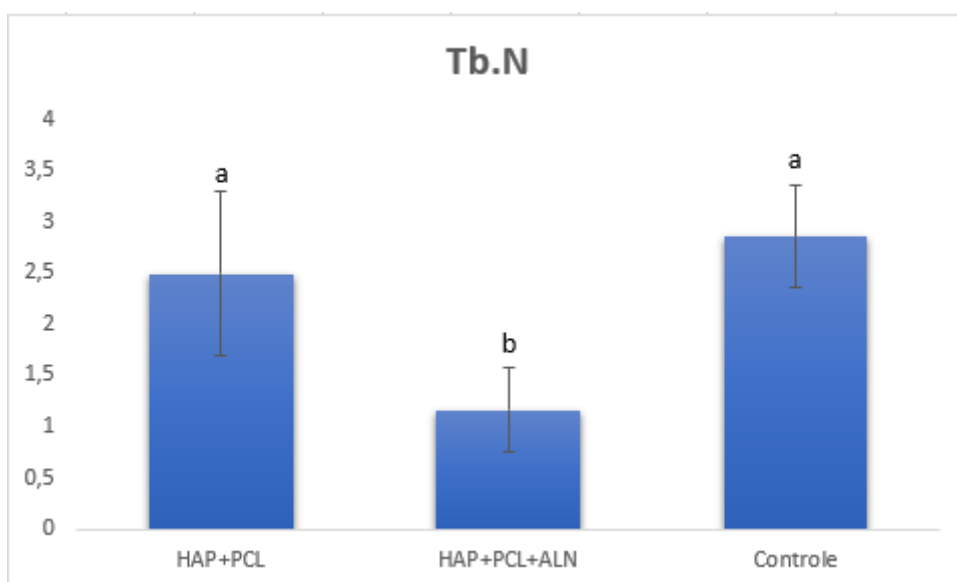


Figura 13: Representação gráfica da média e desvio padrão do número de trabéculas ósseas obtido na análise da microtomografia da região do defeito

ósseo no olecrano de coelho aos 42 dias. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) na análise de variância (ANOVA).

Não houve diferença estatística entre os valores obtidos na análise de Tb.Th. Já para Tb.Sp, a diferença entre os grupos ficou evidente apenas entre o controle (mediana de 0,188) e o HAP+PCL+ALN (mediana de 0,585), tendo o grupo HAP+PCL apresentado valor intermediário.

É importante ressaltar que foi possível distinguir o osso neoformado do biomaterial, uma vez que o padrão visualizado na regeneração óssea do defeito foi característico de osso trabecular como descrito por Abbah et al. (2009) e Bouxsein et al. (2010), enquanto o biomaterial foi visualizado como grânulos radiopacos, restritos à região inicial do defeito.

4.5 Análise histológica

Os padrões histológicos encontrados nos grupos controle e HAP+PCL, foram semelhantes entre si. No período de 42 dias, os dois grupos apresentaram na área do defeito uma neoformação óssea organizada em trabéculas ósseas imaturas, entremeadas à medula óssea e tecido conjuntivo. No interior das trabéculas, foi possível observar osteócitos volumosos em grande quantidade localizados dentro de amplas lacunas (Figura 14).

As características histológicas observadas nos dois grupos descritos foram diferentes dos achados de Ochoa (2013), que relatou uma intensa neoformação óssea, preenchendo todo o defeito aos 45 dias. Fernandes (2004), por sua vez, estudou o efeito do alendronato associado a hidroxiapatita em defeito de mandíbula em coelhas saudáveis e observou um arranjo ósseo lamelar bastante evidente, com osteócitos mais achatados e espaços medulares com dimensões menores, indicando um osso mais maduro no mesmo período de tempo. Neste estudo, aos 42 dias, foi observada uma intensa atividade de neoformação e remodelação óssea, e nenhum animal apresentou fechamento completo do defeito ósseo. Essa diferença pode ser atribuída ao desequilíbrio do metabolismo ósseo presente na osteoporose, uma vez que os referidos autores utilizaram coelhas saudáveis em contraste com o presente trabalho, no qual foram utilizadas coelhas osteopênicas.

Foi possível notar que no grupo HAP+PCL ocorreu contato entre o osso neoformado e biomaterial (Figura 15), indicando que houve osseointegração, conforme descrito por Valente et al. (2016). O compósito HAP+PCL foi eficiente em promover suporte mecânico ao osso, uma vez que, serviu de arcabouço para o crescimento do novo tecido ósseo, sem incitar respostas biológicas indesejáveis.

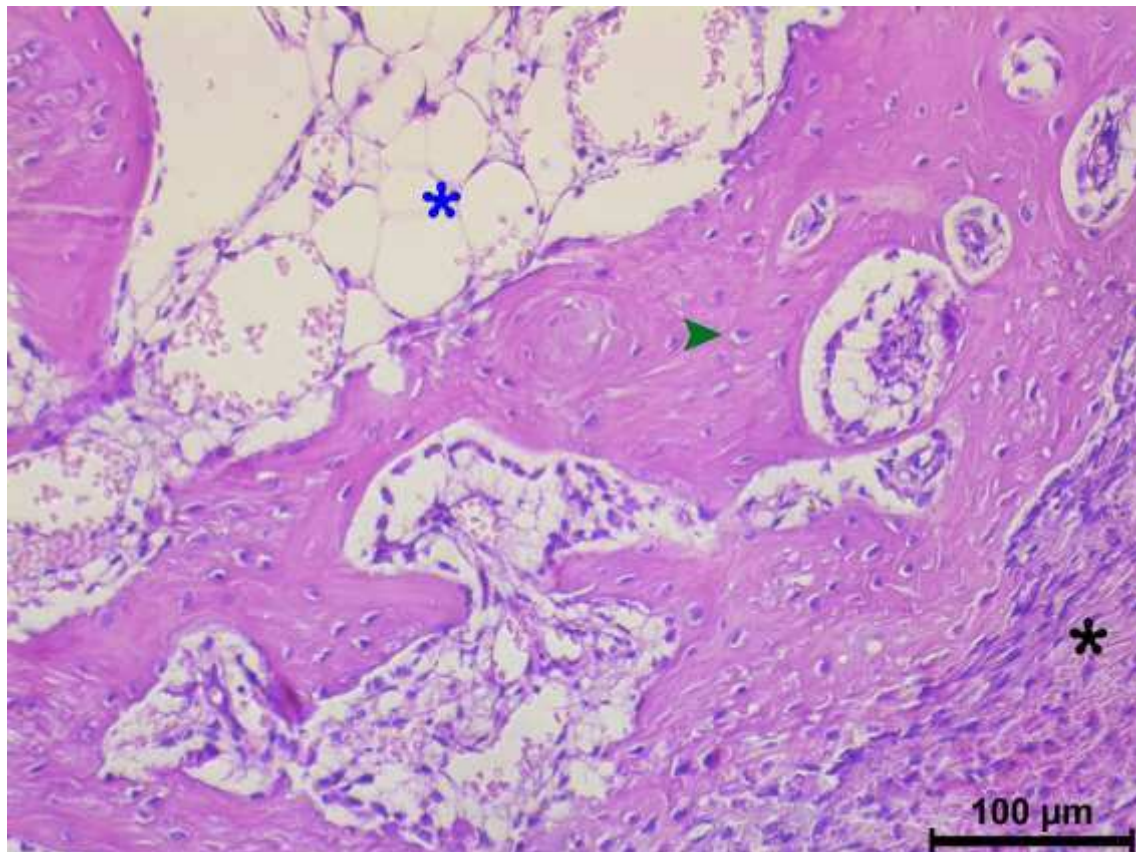


Figura 14: Fotomicrografia da região do defeito realizado no olecrano de coelho após 42 dias da cirurgia. Grupo controle. Notar trabéculas imaturas, contendo osteócitos volumosos (cabeça de seta), entremeadas à medula (asterisco azul) e tecido conjuntivo (asterisco preto). HE, 200X.

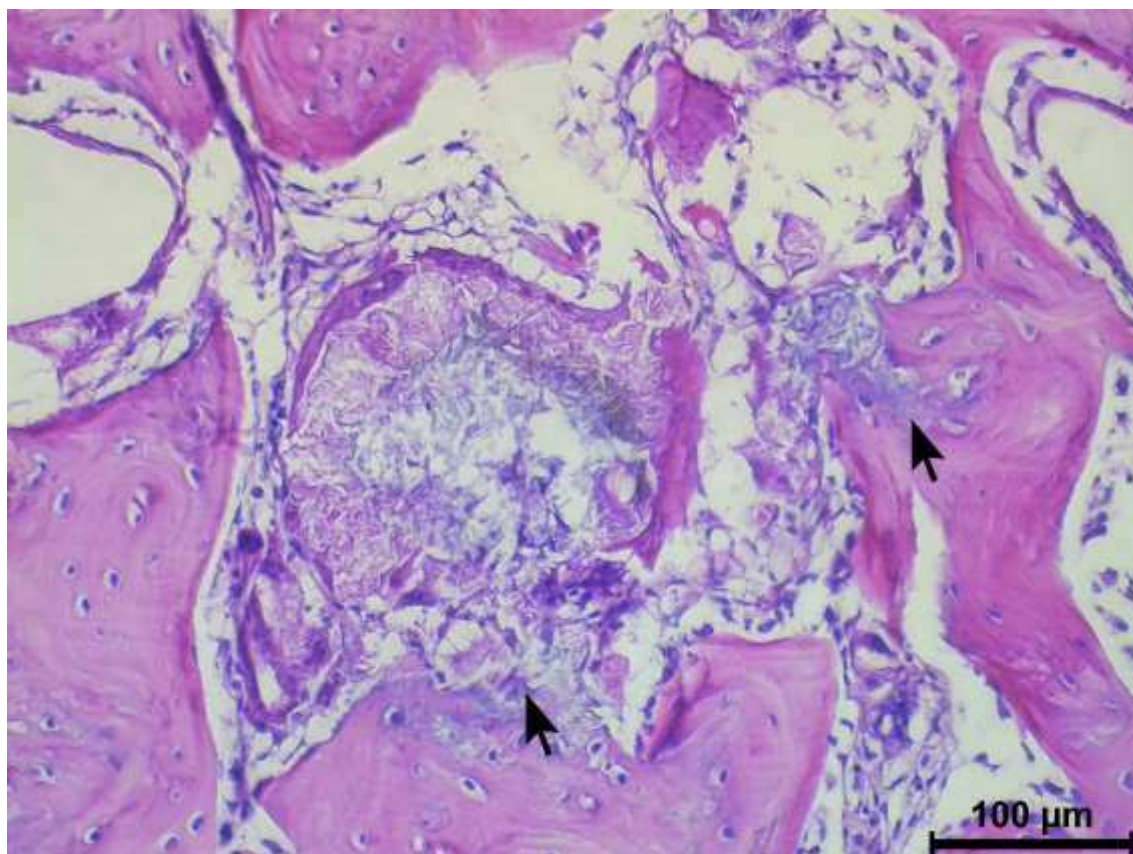


Figura 15: Fotomicrografia da região do defeito realizado no olecrano de coelho após 42 dias da cirurgia. Grupo HAP+PCL. As setas pretas indicam a presença do biomaterial, em contato com o osso neoformado. HE, 200x.

Por outro lado, no grupo HAP+PCL+ALN houve uma tentativa de regeneração do tecido ósseo, através da formação de uma matriz extracelular disposta de maneira desorganizada e que não foi capaz de se diferenciar em tecido conjuntivo ou tecido ósseo mantendo um aspecto histológico semelhante ao encontrado na necrose isquêmica (Figura 16). Foi possível notar também a escassez de vasos sanguíneos na região do defeito ósseo, reforçando a possibilidade da ocorrência de necrose. Em um animal, foi possível visualizar raras trabéculas ósseas delgadas, imaturas, que se restringiam ao fundo do defeito, em contato direto com a cortical medial, que possivelmente forneceu o suprimento necessário para o início dessa formação óssea.

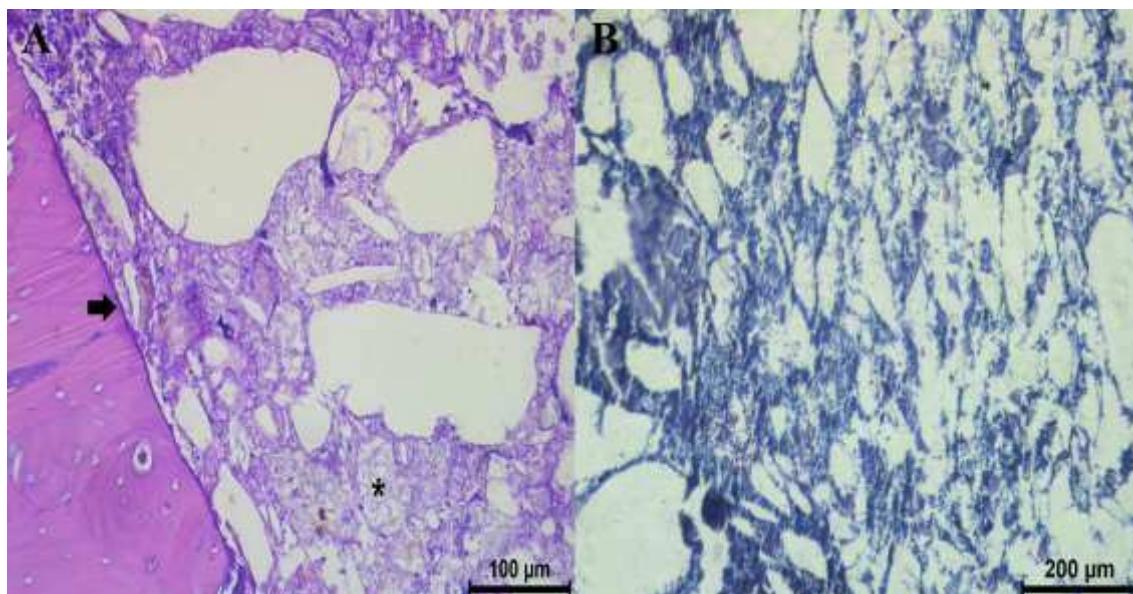


Figura 16: Fotomicrografia da região do defeito realizado no olecrano de coelho após 42 dias da cirurgia. Grupo HAP+PCL+ALN. A – Observar a borda do defeito (seta preta) que permaneceu inalterada, sem indício de remodelação. Presença do biomaterial (asterisco), que se perdeu em grande parte durante a descalcificação do material, restando espaços vazios. HE, 200x. B – Matriz extracelular preenchendo o defeito, sem formação de nenhum outro tecido. Tricômico de Gomori, 100x.

Acredita-se que, no presente estudo, o composto contendo alendronato foi capaz de exercer efeito anti-angiogênico, impedindo a formação de vasos sanguíneos e consequentemente a regeneração óssea, corroborando com o pressuposto por Fournier et al. (2002) e Ishtiaq et al. (2015), os quais observaram a diminuição de importantes fatores angiogênicos na presença do alendronato. Sabe-se que a presença de VEGF e ANG é fundamental para morfogênese vascular, que, por sua vez, é fundamental para a integridade dos tecidos (KIERSZENBAUM, 2012), o que explicaria a ausência da formação de tecidos observada nesse estudo.

Não foram encontradas referências evidenciando a mesma ação deletéria do alendronato na mesma intensidade observada no presente estudo, entretanto, alguns autores observaram atraso na regeneração óssea nos animais que receberam o fármaco. Fernandes (2005) e Canettieri et al. (2009) estudaram o efeito da associação de hidroxiapatita e alendronato e também concluíram que a aplicação local do alendronato prejudicou a neoformação óssea no interior do defeito ósseo. Nobre et al. (2008) demonstraram que os animais que receberam diferentes concentrações de ALN

apresentaram menor neoformação óssea quando comparado ao grupo controle em todos os períodos avaliados. Os autores sugeriram ainda que os bifosfonatos atuam de acordo com a concentração empregada, estimulando a proliferação celular e formação de tecido osteóide em baixas concentrações e inibindo esse processo em maiores concentrações por influenciar a viabilidade celular e prejudicar suas funções metabólicas. Dentro desta linha, García-moreno et al. (1998) comprovaram em estudo *in vitro* que as concentrações mais elevadas, igual ou maior que 10^{-4} mol/L, de alendronato sódico interferiram na viabilidade das células osteoblásticas, prejudicando a sua capacidade proliferativa. Correia et al. (2006) demonstrou ação semelhante do medicamento sobre fibroblastos do ligamento periodontal de humanos, em que as maiores concentrações do alendronato (10^{-5} e 10^{-6} mol) foram consideradas citotóxicas. Baseado nessas observações, outra possível explicação para ausência de regeneração no grupo HAP+PCL+ALN é que a concentração aplicada do ALN diretamente sobre o defeito ósseo afetou a viabilidade celular, desempenhando uma ação tecidual citotóxica que interferiu na regeneração óssea.

Adicionalmente, diversos estudos relacionam a ocorrência de osteonecrose mandibular com o uso de alendronato em altas ou baixas doses por longo período de tempo (GEGLER et al., 2006; NETO, 2012). A osteonecrose mandibular é uma condição clínica caracterizada pela necrose do osso e o mecanismo pelo qual o alendronato causa essa alteração ainda não está completamente elucidado (RUGGIERO et al., 2004). Acredita-se que é causada por uma interação entre o metabolismo ósseo, trauma local, infecção e pouca vascularização (CARTSOS et al., 2008; IZQUIERDO; OLIVEIRA; WEBER, 2011). De acordo com a Associação Americana de Cirurgia Oral e Maxilo Facial (RUGGIERO et al., 2014) a utilização de glicocorticoide concomitante à administração de alendronato é um dos fatores de risco para o desenvolvimento da osteonecrose, o que nos remete às características encontrada nesse estudo: administração do alendronato em um defeito ósseo (trauma local) e associação com glicocorticoide, que foi utilizado na indução da osteoporose. A suspeita de que a interação medicamentosa com o glicocorticoide possuiu papel fundamental na inibição severa da regeneração encontra respaldo na observação de Valente et al. (2016), que ao estudarem o mesmo compósito em

defeitos ósseos de coelhas saudáveis obtiveram resultados semelhantes ao do grupo controle, sem prejuízo na formação óssea.

O resultado obtido na histologia reforçou aquele observado na análise tomográfica, uma vez que o percentual de volume ósseo do grupo HAP+PCL+ALN foi significativamente mais baixo. Além disso, outra observação interessante consiste na maior variação obtida nesse grupo, que também foi observada na histologia. Em um animal do grupo HAP+PCL+ALN houve formação de finas trabéculas ósseas entremeadas à medula óssea, mas que não se conectavam umas às outras como observado nos outros grupos. Esta variação observada, de forma isolada, pode ser atribuída às características individuais de cada animal, alheias ao controle do pesquisador conforme ressalta Carlo et al. (2009).

Apesar dos resultados demonstrarem um efeito significativamente prejudicial do alendronato na regeneração óssea, sabe-se também que o medicamento vem sendo amplamente utilizado, e com muitos resultados positivos (BOANINI et al., 2008; FARINA, 2010; CHEN et al., 2011; PARK et al., 2015; WU et al., 2017). Portanto, tornam-se necessárias novas pesquisas para avaliar a melhor forma de administração, a concentração ideal, e principalmente, elucidar a interação medicamentosa com o glicocorticoide.

5. CONCLUSÃO

O protocolo de indução adotado foi suficiente para provocar uma perda óssea significativa, caracterizando um modelo válido para o estudo de novos tratamentos para a osteoporose.

Com base nos resultados da tomografia e da histologia pode-se concluir que o compósito HAP+PCL foi eficiente no preenchimento de defeitos ósseos no olecrano de coelhas com osteoporose induzida, enquanto o compósito HAP+PCL+ALN inibiu a regeneração óssea.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAH, S. A.; LAM, C. X. L.; HUTMACHER, D. W.; GOH, J. C. H.; WONG, H. K. Biological performance of a polycaprolactone-based scaffold used as fusion cage device in a large animal model of spinal reconstructive surgery. **Biomaterials**, v. 30, n. 28, p. 5086–5093, 2009.
- AJDUKOVIC, Z.; NAJMAN, S.; ORDEVIC, L.; SAVIC, V.; MIHAILOVIC, D.; PETROVIC, D.; IGNJATOVIC, N.; USKOKOVIC, D. Repair of bone tissue affected by osteoporosis with Hydroxyapatite-Poly-L-lactide (HAp-PLLA) with and without blood plasma. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 20, n. 2, p. 179–190, 2005.
- ALFORD, A. I.; KOZLOFF, K. M.; HANKENSON, K. D. Extracellular matrix networks in bone remodeling. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 65, p. 20–31, 2015.
- AMADEI, S. U.; PEREIRA, A. C.; CARVALHO, Y. R. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **Jornal Brasileiro de patologia e medicina laboratorial.**, v. 42, n. 1, p. 5–12, 2006.
- AUBIN, J. E.; HEERSCHE, J. N. M. Bone Cell Biology Osteoblasts, Osteocytes, and Osteoclasts. In: **Pediatric Bone: Biology & Diseases**. 1. ed. United States of America: Elsevier, 2003. p. 43–75.
- BAOFENG, L.; ZHI, Y.; BEI, C.; GUOLIN, M.; QINGSHUI, Y.; JIAN, L. Characterization of a rabbit osteoporosis model induced by ovariectomy and glucocorticoid. **Acta Orthopaedica**, v. 81, n. 3, p. 396–401, 2010.
- BERTI, S. D. A.; SOUZA, P. H. C.; WESTPHALEN, F. H.; WESTPHALEN, V. P. D.; MARTINS, W. D.; IGNÁCIO, S. A.; DENIS, W.; APARECIDO, S. Estudo radiográfico da densidade óssea mandibular em pixels e milímetros equivalentes de alumínio. **Revista Odonto Ciência**, v. 20, n. 49, p. 251–256, 2005.
- BOANINI, E.; TORRICELLI, P.; GAZZANO, M.; GIARDINO, R.; BIGI, A. Alendronate-hydroxyapatite nanocomposites and their interaction with

osteoclasts and osteoblast-like cells. **Biomaterials**, v. 29, n. 7, p. 790–796, 2008.

BÖLGEN, N.; MENCELOĞLU, Y. Z.; ACATAY, K.; VARGEL, İ.; PIŞKIN, E. In vitro and in vivo degradation of non-woven materials made of poly(ε-caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 16, n. 12, p. 1537–1555, 2005.

BORGES, A. P. B.; REZENDE, C. M. F.; RIBEIRO, M. F. B.; MELO, E. G.; NÓBREGA NETO, P. I. Hidroxiapatita sintética como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: Aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 6, p. 616–620, 2000.

BOUXSEIN, M. L.; BOYD, S. K.; CHRISTIANSEN, B. A.; GULDBERG, R. E.; JEPSEN, K. J.; MÜLLER, R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 7, p. 1468–1486, 2010.

CANALIS, E.; MAZZIOTTI, G.; GIUSTINA, A.; BILEZIKIAN, J. P. Glucocorticoid-induced osteoporosis : pathophysiology and therapy. **Osteoporosis International**, v. 18, p. 1319–1328, 2007.

CANETTIERI, A. C. V.; COLOMBO, C. E. D.; CHIN, C. M.; FAIG-LEITE, H. Femur bone repair in ovariectomized rats under the local action of alendronate , hydroxyapatite and the association of alendronate and hydroxyapatite. **International Journal of experimental pathology**, v. 90, p. 520–526, 2009.

CAPULLI, M.; PAONE, R.; RUCCI, N. Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 561, p. 3–12, 2014.

CARLO, E. C.; BORGES, A. P. B.; VARGAS, M. I. V.; MARTINEZ, M. M.; ELEOTÉRIO, R. B.; DIAS, A. R.; RODRIGUES, M. C. D. Resposta tecidual ao composto 50% hidroxiapatita: 50% poli-hidroxibutirato para substituição óssea em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 4, p. 844–852, 2009.

- CARTSOS, V. M.; MS, D. M. D.; ZHU, S.; ZAVRAS, A. I.; MS, D. M. D. Bisphosphonate Use and the Risk of Adverse Jaw Outcomes. **The Journal of the American Dental Association**, v. 139, n. 1, p. 23–30, 2008.
- CASTAÑEDA, S.; CALVO, E.; LARGO, R.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, R.; DE LA PIEDRA, C.; DÍAZ-CURIEL, M.; HERRERO-BEAUMONT, G. Characterization of a new experimental model of osteoporosis in rabbits. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 26, n. 1, p. 53–59, 2008.
- CHEN, F.; LAM, W. M.; LIN, C. J.; QIU, G. X.; WU, Z. H.; LUK, K. D. K.; LU, W. W. Biocompatibility of Electrophoretical Deposition of Nanostructured Hydroxyapatite Coating on Roughen Titanium Surface: In Vitro Evaluation Using Mesenchymal Stem Cells. **Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials**, v. 82, p. 183–189, 2007.
- CHEN, G.; USHIDA, T.; TATEISHI, T. Scaffold Design for Tissue Engineering. **Macromolecular Bioscience**, v. 2, n. 2, p. 67–77, 2002.
- CHEN, J.; LUO, Y.; HONG, L.; LING, Y.; PANG, J.; FANG, Y.; WEI, K.; GAO, X. Synthesis, characterization and osteoconductivity properties of bone fillers based on alendronate-loaded poly(ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite microspheres. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, n. 3, p. 547–555, 2011.
- CHO, Y. S.; HONG, M. W.; JEONG, H.; LEE, S.; KIM, Y. Y.; CHO, Y. The fabrication of well-interconnected polycaprolactone / hydroxyapatite composite scaffolds , enhancing the exposure of hydroxyapatite using the wire-network molding technique. **Journal of Biomedical Materials Research B**, v. 105B, n. 8, p. 2315–2325, 2017.
- CHOW, L. C. Next generation calcium phosphate-based biomaterials. **Dental Materials Journal**, v. 28, n. 1, p. 1–10, 2009.
- CIPITRIA, A.; SKELTON, A.; DARGAVILLE, T. R.; DALTON, P. D.; HUTMACHER, D. W. Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds—a review. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 26, p. 9419, 2011.
- CORREIA, V. de F. P.; CALDEIRA, C. L.; MARQUES, M. M. Cytotoxicity

evaluation of sodium alendronate on cultured human periodontal ligament fibroblasts. **Dental traumatology**, v. 22, n. 4, p. 312–317, 2006.

CORSINI, C. M. M.; BORGES, A. P. B.; ALBERTO, D. S.; JOSÉ, R. M.; SILVA, C. H. O. Incidência de infecção do sítio cirúrgico e fatores de risco associados na clínica cirúrgica de pequenos animais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 3, p. 737–744, 2014.

COSTA, A. C. F. M.; LIMA, M. G.; LIMA, L. H. M. A.; CORDEIRO, V. V.; VIANA, K. M. S.; SOUZA, V.; LIRA, H. L. Hidroxiapatita : Obtenção, caracterização e aplicações. **Revista eletrônica de Materiais e Processos**, v. 4, n. 3, p. 29–38, 2009.

DAVIES, J. E.; MATTA, R.; MENDES, V. C.; CARVALHO, P. S. P. De. Development , characterization and clinical use of a biodegradable composite scaffold for bone engineering in oro-maxillo-facial surgery. **Organogenesis**, v. 6, n. 3, p. 161–166, 2010.

DUARTE, T. S.; BORGES, A. P. B.; LAVOR, M. S. L.; FILGUEIRAS, R.; TSIMIS, A. C.; FANFANO, G.; ODENTHAL, M. E.; PONTES, K. C. S. Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães: Aspectos clínicos e radiográficos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 114–118, 2007.

EASTELL, R.; O'NEILL, T. W.; HOFBAUER, L. C.; LANGDAHL, B.; REID, I. R.; GOLD, D. T.; CUMMINGS, S. R. Postmenopausal osteoporosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 1–16, 2016.

FABBRI, P.; BONDIOLI, F.; MESSORI, M.; BARTOLI, C.; DINUCCI, D.; CHIELLINI, F. Porous scaffolds of polycaprolactone reinforced with in situ generated hydroxyapatite for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 1, p. 343–351, 2010.

FARINA, V. H. **Efeitos da Calcarea phosphorica 6CH e do alendronato na reparação da lesão óssea em ratas ovariectomizadas**. 2010. 140f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São Jose dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2010.

FERNANDES, C.; LEITE, R. S.; LANÇAS, F. M. Bisfosfonatos: Síntese,

análises químicas e aplicações farmacológicas. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 274–280, 2005.

FERNANDES, P. G. **Aplicação da Microtomografia Computadorizada para a Análise Morfométrica Bi e Tridimensional na Avaliação da Perda Óssea Experimental em Ratos**. 2014. 124f. Tese (Doutorado em Periodontia) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2014.

FERNANDES, R. G. **Estudo da ação do alendronato sódico, da hidroxiapatita e da associação alendronato sódico com a hidroxiapatita, no reparo ósseo de fêmures de ratos**. 2005. 127f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2005.

FILHO, J. R. C. do P.; STERMAN, F. de A. Avaliação da densidade mineral óssea em potros da raça Puro Sangue Inglês em início de treinamento. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 6, p. 384–388, 2004.

FOURNIER, P.; BOISSIER, S.; GUGLIELMI, J.; CABON, F.; COLOMBEL, M.; CLE, P. Bisphosphonates Inhibit Angiogenesis in Vitro and Testosterone-stimulated Vascular Regrowth in the Ventral Prostate in Castrated Rats. **Cancer Research**, v. 62, p. 6538–6544, 2002.

GALI, J. C. Osteoporose. **Acta Ortop Bras**, v. 9, n. 2, p. 3–12, 2001.

GARCÍA-MORENO, C.; SERRANO, S.; NACHER, M.; FARRÉ, M.; DÍEZ, A.; MARIÑOSO, M. L.; CARBONELL, J.; MELLIBOVSKY, L.; NOGUÉS, X.; BALLESTER, J.; AUBÍA, J. Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts. **Bone**, v. 22, n. 3, p. 233–239, 1998.

GEGLER, A.; CHERUBINI, K.; FIGUEIREDO, M. A. Z.; YURGEL, L. S.; AZAMBUJA, A. A. Bisfosfonatos e osteonecrose maxilar : revisão da literatura e relato de dois casos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 1, p. 25–31, 2006.

GODOY, C. L. B.; VULCANO, L. C.; SANTOS, F. A. M. S.; SOARES, J. C. M. Valores normais da densidade mineral óssea do acessório do carpo em

equínos da raça Brasileiro de Hipismo (BH) determinados por meio da densitometria óptica em imagem radiográfica. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 607–610, 2005.

GOODMAN, S. B.; YAO, Z.; KEENEY, M.; YANG, F. The future of Biologic Coating for Orthopaedic Implants. **Biomaterials**, v. 34, n. 13, p. 3174–3183, 2013.

HABIBOVIC, P.; YUAN, H.; VALK, C. M. Van Der; MEIJER, G.; BLITTERSWIJK, C. A. Van; GROOT, K. De. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. **Biom**, v. 26, p. 3565–3575, 2005.

HOFBAUER, L. C.; SCHOPPET, M. Clinical Implications of the Osteoprotegerin/ RANKL/RANK System for Bone and Vascular Diseases. **American Medical Association**, v. 292, n. 4, p. 490–495, 2004.

HUANG, J.; LIN, Y. W.; FU, X. W.; BEST, S. M.; BROOKS, R. A.; RUSHTON, N.; BONFIELD, W. Development of nano-sized hydroxyapatite reinforced composites for tissue engineering scaffolds. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 11, p. 2151–2157, 2007.

ISHTIAQ, S.; EDWARDS, S.; SANKARALINGAM, A.; EVANS, B. A. J.; ELFORD, C.; FROST, M. L.; FOGELMAN, I.; HAMPSON, G. The effect of nitrogen containing bisphosphonates, zoledronate and alendronate, on the production of pro-angiogenic factors by osteoblastic cells. **Cytokine**, v. 71, n. 2, p. 154–160, 2015.

IWATA, K.; LI, J.; FOLLET, H.; PHIPPS, R. J.; BURR, D. B. Bisphosphonates suppress periosteal osteoblast activity independently of resorption in rat femur and tibia. **Bone**, v. 39, n. 5, p. 1053–1058, 2006.

IZQUIERDO, C. D. M.; OLIVEIRA, M. G.; WEBER, J. B. B. Terapêutica com bisfosfonatos: implicações no paciente odontológico—revisão de literatura. **RFO**, v. 16, n. 3, p. 347–352, 2011.

JANDT, K. D. Evolutions, revolutions and trends in biomaterials science -A perspective. **Advanced Engineering Materials**, v. 9, n. 12, p. 1035–1050, 2007.

KAVEH, K.; IBRAHIM, R.; ABUBAKAR, M. Z.; IBRAHIM, T. A. Osteoporosis Induction in Animal Model. **American Journal of Animal Veterinary Sciencies**, v. 5, n. 2, p. 139–145, 2010.

KHAN, Y.; YASZEMSKI, M. J.; MIKOS, A. G.; LAURENCIN, C. T. Tissue Engineering of Bone: Material and Matrix Considerations. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 90, p. 36–42, 2008.

KHOSLA, S.; OURSLER, M. J.; MONROE, D. G. Estrogen and the Skeleton. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 23, n. 11, p. 576–581, 2012.
KIRSZENBAUM, A. L. **Histologia E Biologia Celular**. 3ª edição ed. [s.l.] Elsevier Brasil, 2012.

KIM, H.-W. Biomedical nanocomposites of hydroxyapatite/ polycaprolactone obtained by surfactant mediation. **Journal of Biomedical Material Research Part A**, v. 33, p. 169–177, 2007.

KIM, H.-W.; KNOWLES, J. C.; KIM, H.-E. Development of hydroxyapatite bone scaffold for controlled drug release via poly(ϵ -caprolactone) and hydroxyapatite hybrid coatings. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 70B, n. 2, p. 240–249, 2004.

KNOCH, F. Von; JAQUIERY, C.; KOWALSKY, M.; SCHAEEREN, S.; ALABRE, C.; MARTIN, I.; RUBASH, H. E.; SHANBHAG, A. S. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. **Biomaterials**, v. 26, n. 34, p. 6941–6949, 2005.

KORKIA, P. Osteoporosis : process , prevention and treatment. **Journal Lecturer in Sport and Exercise Science**, v. 6, n. 3, p. 156–169, 2002.

LANNA, C. M. M.; MONTENEGRO JR., R. M.; PAULA, F. J. . Fisiopatologia da osteoporose induzida por glicocorticóide. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 1, p. 9–18, 2003.

LEE, E. J.; HUH, B. K.; KIM, S. N.; LEE, J. Y.; PARK, C. G.; MIKOS, A. G.; CHOY, Y. Bin. Application of materials as medical devices with localized drug delivery capabilities for enhanced wound repair. **Progress in Materials Science**, v. 89, p. 392–410, 2017.

LIU, H.; WEBSTER, T. J. Mechanical properties of dispersed ceramic nanoparticles in polymer composites for orthopedic applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, p. 299–313, 2010.

LOUZADA, M. J. Q.; PELÁ, C. A.; BELANGERO, W. D.; SANTOS- PINTO, R. Avaliações de densidade óssea em imagens radiográficas: Estudo em peças ósseas de cães. **Caderno de Engenharia Biomédica**, v. 14, n. 1, p. 47–64, 1998.

MANCINI, T.; DOGA, M.; GIUSTINA, A. Cushing's Syndrome and Bone. **Pituitary**, v. 7, p. 243–246, 2004.

MARTINI, L. A.; MOURA, E. C.; SANTOS, L. C.; MALTA, D. C.; PINEIRO, M. M. Prevalência de diagnóstico auto-referido de osteoporose , Brasil , 2006
Prevalence of self-reported diagnosis of osteoporosis in Brazil , 2006. v. 43, n. Supl 2, p. 107–116, 2009.

MASHIBA, T.; HIRANO, T.; TURNER, C. H.; FORWOOD, M. R.; JOHNSTON, C. C.; BURR, D. B. Suppressed Bone Turnover by Bisphosphonates Increases Microdamage Accumulation and Reduces Some Biomechanical Properties in Dog Rib. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 15, n. 4, p. 613–620, 2000.

MIKAMI, Y.; MATSUMOTO, T.; KANO, K.; TORIUMI, T.; SOMEI, M.; HONDA, M. J.; KOMIYAMA, K. Current status of drug therapies for osteoporosis and the search for stem cells adapted for bone regenerative medicine. **Anatomical Science International**, v. 89, n. 1, p. 1–10, 2014.

MORAES, L. F. S.; SILVA, E. N. da; SILVA, D. A. S.; PAULA, A. P. de. Gastos com o tratamento da osteoporose em idosos do Brasil (2008 – 2010): análise dos fatores associados. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 17, n. 3, p. 719–734, 2014.

MURAMOTO, C.; STERMAN, F. de A.; PINTO, A. C. B. de C. Estabelecimento de valores de densidade mineral óssea (DMO) das regiões metafisária e diafisária do rádio em cães da raça Poodle por meio da Densitometria Óptica Radiográfica. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 2, p. 89–97, 2005.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials.

Progress in polymer science, v. 32, n. 32, p. 762–798, 2007.

NAKAGAWA, N.; KINOSAKI, M.; YAMAGUCHI, K.; SHIMA, N.; YASUDA, H.; YANO, K.; MORINAGA, T.; HIGASHIO, K. RANK Is the Essential Signaling Receptor for Osteoclast Differentiation Factor in Osteoclastogenesis.

Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 253, n. 2, p. 395–400, 1998.

NETO, N. C. **Uso de alendronato para indução de osteonecrose**

experimental : estudo em ratos. 2012. 270f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, 2012.

NIH, O. and R. B. D. N. R. C. Osteoporosis in men. **NIH Osteoporosis and Related Bone Diseases National Resource Center**, p. 1–5, 2015.

NOBRE, M. D. P.; FERNANDES, R. G.; CHIN, C. M.; FAIG-LEITE, H. Ação Local do Alendronato Sódico na Reparação Óssea de Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR). **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 90, n. 4, p. 261–268, 2008.

OCHOA, C. C. R. **Hidroxiapatita, policaprolactona e alendronato em defeitos ósseos experimentais no olecrano de coelhos**. 2013. 43f.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 2013.

ODVINA, C. V.; ZERWEKH, J. E.; RAO, D. S.; MAALOUF, N.; GOTTSCHALK, F. A.; PAK, C. Y. C. Severely suppressed bone turnover: A potential complication of alendronate therapy. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, n. 3, p. 1294–1301, 2005.

OSATHANON, T.; CHANJAVANAKUL, P.; KONGDECHA, P.; CLAYHAN, P.; HUYNH, N. C.-N. Polycaprolactone-Based Biomaterials for Guided Tissue Regeneration Membrane. In: **Periodontitis - A Useful Reference successful**. InTech, 2017. p. 171–188.

PARK, K. W.; YUN, Y. P.; KIM, S. E.; SONG, H. R. The effect of alendronate loaded biphasic calcium phosphate scaffolds on bone regeneration in a rat tibial

defect model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 11, p. 26738–26753, 2015.

PERDIGÃO, A. P. L. **Compósito de hidroxiapatita, fibroína da seda e ácido hialurônico em defeitos ósseos experimentais na ulna de coelhos**. 2015. 82f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 2015.

PINHEIRO, M. D. M.; EIS, S. R. Epidemiology of osteoporotic fractures in Brazil : what we have and what we need. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 54, n. 2, p. 164–170, 2010.

PRECHEUR, H. V. Bone Graft Materials. **Dental Clinics of North America**, v. 51, n. 3, p. 729–746, 2007.

RADOMINSKI, S. C.; PINTO-NETO, A. M.; MARINHO, R. M.; COSTA-PAIVA, L. H. S.; PEREIRA, A. S.; URBANETZ, A. A.; FERRARI, A. E. M.; BARACAT, E. C. Osteoporose em Mulheres na Pós-Menopausa. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 44, n. 6, p. 426–434, 2004.

REIS, E. C. C.; BORGES, A. P. B.; FONSECA, C. C.; MARTINEZ, M. M. M.; ELEOTÉRIO, R. B.; MORATO, G. O.; OLIVEIRA, P. M. Biocompatibility, Osteointegration, Osteoconduction, and Biodegradation of a Hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate Composite. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 4, p. 817–826, 2010.

ROBERT, P. M.; FRANK, R. M. Periodontal guided tissue regeneration with a new resorbable polyactic acid membrane. **Journal of Periodontology**, v. 65, n. 5, p. 414–422, 1994.

RUGGIERO, S. L.; DODSON, T. B.; FANTASIA, J.; GOODDAY, R.; AGHALOO, T.; MEHROTRA, B.; O'RYAN, F. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw—2014 Update. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 72, n. 10, p. 1938–1956, 2014.

RUGGIERO, S. L.; MEHROTRA, B.; ROSENBERG, T. J.; ENGROFF, S. L. Osteonecrosis of the Jaws Associated with the Use of Bisphosphonates: A Review of 63 Cases. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, n. 5, p.

527–534, 2004.

SILVA, E. C.; BORGES, A. P. B.; NEVES, C. D.; CARLO, E. C.; BARROS, R. E.; HAGE, M. C. F. N. S.; SOUZA, R. L.; SOUZA, M. A.; BARUD, H. S.; BICALHO, S. M. C. M. Utilização experimental de hidroxiapatita sintética em alvéolos dentários de gatos domésticos (*Felis catus*): estudo clínico, radiográfico e histomorfométrico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 4, p. 873–880, 2012.

SOUZA, M. C.; ASSEMANY, F. S.; LIMA, A. T. C.; SOUZA, R. F. Glicocorticoides e osteoporose – artigo de revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, n. 1, p. 57–64, 2010.

SOUZA, M. P. G. de. Diagnóstico e tratamento da osteoporose. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 45, n. 3, p. 220–229, 2010.

STEEVE, K. T.; MARC, P.; SANDRINE, T.; DOMINIQUE, H.; YANNICK, F. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 15, p. 49–60, 2004.

TANAKA, T.; HIROSE, M.; KOTOBUKI, N.; OHGUSHI, H.; FURUZONO, T.; SATO, J. Nano-scaled hydroxyapatite/silk fibroin sheets support osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal cells. **Materials Science and Engineering: C**, v. 27, n. 4, p. 817–823, maio 2007.

TOLL, P. W.; GROSS, K. L.; BERRYHILL, S. A.; JEWELL, D. E. Usefulness of dual energy X-ray absorptiometry for body composition measurement in adult dogs. **The Journal of Nutrition**, v. 124, p. 260s–2603, 1994.

TÖTH, M.; GROSSMAN, A. Glucocorticoid-induced osteoporosis: Lessons from Cushing's syndrome. **Clinical Endocrinology**, v. 79, n. 1, p. 1–11, 2013.

TRUEDSSON, A.; WANG, J. S.; LINDBERG, P.; GORDH, M.; SUNZEL, B.; WARFVINGE, G. Bone substitute as an on-lay graft on rat tibia. **Clinical Oral Implants Research**, v. 21, n. 4, p. 424–429, 2010.

UNDURTI, N. Catechins and osteoporosis. **Nutrition**, v. 29, p. 697–699, 2013.

VACCARO, A. R.; SINGH, K.; HAID, R.; KITCHEL, S.; WUISMAN, P.; TAYLOR, W.; BRANCH, C.; GARFIN, S. The use of bioabsorbable implants in

the spine. **The Spine Journal**, v. 3, p. 227–237, 2003.

VALENTE, F. L.; REIS, E. C. C.; SEPÚLVEDA, R. V.; OCHOA, C. C. R.; SANTOS, L. C.; CORSINI, C. M.; BORGES, A. P. B. Hydroxyapatite, polycaprolactone and alendronate composites for bone regeneration in rabbits' olecranon: Histological features. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 2, p. 543–547, 2016.

VITAL, C. C.; BORGES, A. P. B.; FONSECA, C. C.; CAMACHO, B. G.; NEGREIROS, R. M. Hidroxiapatita associada à lignina no preenchimento de falha óssea experimental na tíbia de coelhos. **Revista Ceres**, v. 55, n. 1, p. 9–14, 2008.

WALSH, M. C.; CHOI, Y. Biology of the TRANCE axis. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 14, p. 251–263, 2003.

WANG, M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. **Biomaterials**, v. 24, p. 2133–2151, 2003.

World Health Organization (WHO). **Assessment of fracture risk and its 43 application to screening for postmenopausal osteoporosis**. p. 1-130, 1994.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 35, n. 10, p. 1217–1256, 2010.

WU, H.; LEI, P.; LIU, G.; ZHANG, Y. S.; YANG, J.; ZHANG, L.; XIE, J.; NIU, W.; LIU, H.; RUAN, J.; HU, Y.; ZHANG, C. Reconstruction of Large-scale Defects with a Novel Hybrid Scaffold Made from Poly(L-lactic acid)/Nanohydroxyapatite/Alendronate-loaded Chitosan Microsphere: In vitro and in vivo Studies. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.